

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-045192

(43)Date of publication of application : 12.02.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 37/00

(21)Application number : 2001-173341

(71)Applicant : BECTON DICKINSON & CO

(22)Date of filing : 08.06.2001

(72)Inventor : NADEAU JAMES G
HELLYER TOBIN J

(30)Priority

Priority number : 2000 590061 Priority date : 08.06.2000 Priority country : US

(54) PROBE AND METHOD FOR DETECTION OF NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a material and a method for detection of a nucleic acid target sequence.

SOLUTION: The invention employs an unlabeled signal primer comprising a 5'-side adapter sequence for detection of the nucleic acid target sequence. The detection system further comprises a reporter probe, the 3'-side end of which hybridizes to the complementary chain of the 5'-side adapter sequence of the signal primer to produce a 5'-side overhang. Polymerase is used to fill in the overhang and synthesize the complement of the 5'-side overhang of the reporter probe. Synthesis of the reporter probe complementary chain is detected, either directly or indirectly, as an indication of the presence of the target.

【 外国語明細書 】

1. Title of Invention

PROBES AND METHODS FOR DETECTION OF NUCLEIC ACIDS

2. Claims

1. A method for detecting a nucleic acid target sequence comprising:
 - a) hybridizing a signal primer comprising an adapter sequence to the target sequence, whereby a complement of the adapter sequence is produced;
 - b) hybridizing a reporter probe comprising a reporter moiety to the complement of the adapter sequence, whereby a double-stranded reporter moiety is produced, and;
 - c) detecting synthesis of the complement of the reporter moiety as an indication of the presence of the target sequence.
2. The method of Claim 1 wherein the double-stranded reporter moiety is produced upon hybridization of the reporter moiety to the complement of the adapter sequence.
3. The method of Claim 1 wherein the double-stranded reporter moiety is produced upon synthesis of a complement of the reporter moiety.
4. The method of Claim 1 wherein the complement of the adapter sequence is synthesized concurrently with target amplification.
5. A method for detecting amplification of a target sequence comprising, in an amplification reaction:
 - a) hybridizing a signal primer comprising an adapter sequence to the target sequence;
 - b) extending the signal primer on the target sequence to produce an extension product;
 - c) hybridizing an amplification primer to the extension product and extending the amplification primer to synthesize a complement of the adapter sequence;
 - d) hybridizing to the complement of the adapter sequence a reporter probe comprising a reporter moiety, whereby a double-stranded reporter moiety is produced;
 - e) detecting the double-stranded reporter moiety as an indication of amplification of the target sequence.

6. The method of Claim 5 wherein the double-stranded reporter moiety is produced upon hybridization of the reporter moiety to the complement of the adapter sequence.

7. A method for detecting a nucleic acid target sequence comprising:

- a) hybridizing a signal primer comprising an adapter sequence to the target sequence such that the adapter sequence produces a 5' overhang;
- b) hybridizing a complement of the adapter sequence by extension of the hybridized target sequence;
- c) hybridizing a reporter probe comprising a reporter moiety to the complement of the adapter sequence, whereby a double-stranded reporter moiety is produced, and;
- d) detecting the double-stranded reporter moiety as an indication of the presence of the target sequence.

8. The method of Claim 7 wherein the double-stranded reporter moiety is produced upon hybridization of the reporter moiety to the complement of the adapter sequence.

9. A set of oligonucleotides for detecting a target sequence comprising:

- a) an unlabeled signal primer comprising a single oligonucleotide having a 3' target binding sequence and a 5' adapter sequence, and;
- b) a reporter probe comprising a 5' reporter moiety and 3' sequence which is substantially identical to the adapter sequence.

10. The set of oligonucleotides of Claim 9 further comprising a second signal primer having an adapter sequence which is substantially identical to an adapter sequence of a first signal primer.

11. The set of oligonucleotides of Claim 9 further comprising a second signal primer having an adapter sequence which is different from an adapter sequence of a first signal primer.

12. The set of oligonucleotides of Claim 9 wherein the reporter moiety is labeled.

3. Detailed Explanation of the Invention

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to materials and methods for detecting nucleic acid target sequences.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Sequence-specific hybridization of labeled oligonucleotide probes has long been used as a means for detecting and identifying selected nucleotide sequences, and labeling of such probes with fluorescent labels has provided a relatively sensitive, nonradioactive means for facilitating detection of probe hybridization. Recently developed detection methods employ the process of fluorescence energy transfer (FET) rather than direct detection of fluorescence intensity for detection of probe hybridization. Fluorescence energy transfer occurs between a donor fluorophore and a quencher dye (which may or may not be a fluorophore) when the absorption spectrum of one (the quencher) overlaps the emission spectrum of the other (the donor) and the two dyes are in close proximity. Dyes with these properties are referred to as donor/quencher dye pairs or energy transfer dye pairs. The excited-state energy of the donor fluorophore is transferred by a resonance dipole-induced dipole interaction to the neighboring quencher. This results in quenching of donor fluorescence. In some cases, if the quencher (also referred to as an "acceptor") is also a fluorophore, the intensity of its fluorescence may be enhanced. The efficiency of energy transfer is highly dependent on the distance between the donor and quencher, and equations predicting these relationships have been developed by Förster (1948, *Ann. Phys.* **2**, 55-75). The distance between donor and quencher dyes at which energy transfer efficiency is 50% is referred to as the Förster distance (R_0). Other mechanisms of fluorescence quenching are also known including, for example, charge transfer and collisional quenching. In these cases the quencher may be a fluorescent dye but it need not be. Fluorescence quenching mechanisms that are not based on FET typically do not require appreciable overlap between the absorption spectrum of the quencher and the emission spectrum of the donor fluorophore.

Energy transfer and other mechanisms which rely on the interaction of two dyes in close proximity to produce quenching are an attractive means for detecting or identifying nucleotide sequences, as such assays may be conducted in homogeneous formats. Homogeneous assay formats

are simpler than conventional probe hybridization assays which rely on detection of the fluorescence of a single fluorophore label, as heterogeneous assays generally require additional steps to separate hybridized label from free label. Typically, FET and related methods have relied upon monitoring a change in the fluorescence properties of one or both dye labels when they are brought together by the hybridization of two complementary oligonucleotides. In this format, the change in fluorescence properties may be measured as a change in the amount of energy transfer or as a change in the amount of fluorescence quenching, typically indicated as an increase in the fluorescence intensity of one of the dyes. In this way, the nucleotide sequence of interest may be detected without separation of unhybridized and hybridized oligonucleotides. The hybridization may occur between two separate complementary oligonucleotides, one of which is labeled with the donor fluorophore and one of which is labeled with the quencher. In double-stranded form there is decreased donor fluorescence (increased quenching) and/or increased energy transfer as compared to the single-stranded oligonucleotides. Several formats for FET hybridization assays are reviewed in *Nonisotopic DNA Probe Techniques* (1992, Academic Press, Inc., pgs. 311-352). Alternatively, the donor and quencher may be linked to a single oligonucleotide such that there is a detectable difference in the fluorescence properties of one or both when the oligonucleotide is unhybridized vs. when it is hybridized to its complementary sequence. In this format, donor fluorescence is typically increased and energy transfer/quenching are decreased when the oligonucleotide is hybridized. For example, an oligonucleotide labeled with donor and quencher dyes may contain self-complementary sequences that base-pair to form a hairpin which brings the two dyes into close spatial proximity where energy transfer and quenching can occur. Hybridization of this oligonucleotide to its complementary sequence in a second oligonucleotide disrupts the hairpin and increases the distance between the two dyes, thus reducing quenching. See Tyagi and Kramer (1996, *Nature Biotech.* 14, 303-308) and B. Bagwell, et al. (1994, *Nucl. Acids Res.* 22, 2424-2425; U.S. Patent No. 5,607,834). Homogeneous methods employing energy transfer or other mechanisms of fluorescence quenching for detection of nucleic acid amplification have also been described. L. G. Lee, et al. (1993, *Nuc. Acids Res.* 21, 3761-3766) disclose a real-time detection method in which a doubly-labeled detector probe is cleaved in a target amplification-specific manner during PCR. The detector probe is hybridized downstream of the amplification primer so that the 5'-3' exonuclease activity of Taq polymerase digests the detector probe, separating two fluorescent dyes which form an energy transfer pair. Fluorescence intensity increases as the probe is cleaved.

Signal primers (sometimes also referred to as detector probes) which hybridize to the target sequence downstream of the hybridization site of the amplification primers have been described for homogeneous detection of nucleic acid amplification (U.S. Patent No. 5,547,861 which is incorporated herein by reference). The signal primer is extended by the polymerase in a manner similar to extension of the amplification primers. Extension of the amplification primer displaces the extension

product of the signal primer in a target amplification-dependent manner, producing a double-stranded secondary amplification product which may be detected as an indication of target amplification. Examples of homogeneous detection methods for use with single-stranded signal primers are described in U.S. Patent No. 5,550,025 (incorporation of lipophilic dyes and restriction sites) and U.S. Patent No. 5,593,867 (fluorescence polarization detection). More recently signal primers have been adapted for detection of nucleic acid targets using FET methods which employ unfolding of secondary structures (e.g., U.S. Patent 5,691,145 and US 5,928,869). Partially single-stranded, partially double-stranded signal primers labeled with donor/quencher dye pairs have also recently been described. For example, US 5,846,726 discloses signal primers with donor/quencher dye pairs flanking a single-stranded restriction endonuclease recognition site. In the presence of the target, the restriction site becomes double-stranded and cleavable by the restriction endonuclease. Cleavage separates the dye pair and decreases donor quenching.

US Patent No. 5,866,336 describes use of a fluorescently labeled hairpin on an amplification primer in PCR. The 3' end of the hairpin primer hybridizes to the complement of a non-target sequence appended to the target by a second primer. In this system, the hairpin primer plays an integral part in amplification of the target sequence and must be extendible. In contrast, in the present invention it is not necessary for the reporter probe to be extendible, as it does not participate in amplification of the target sequence but generates signal in a separate series of reaction steps which occur concurrently with target amplification. In further contrast, the signal primers of the invention hybridize to an internal sequence of the target (i.e., between the amplification primers), so that the signal generation reaction detects a subsequence of the target, not the amplification product itself.

Other fluorescence quenching methods for detection of a target sequence employ cleavage of a restriction site produced by direct hybridization of a probe containing the single-stranded restriction site to the single-stranded target. Japanese Patent No. 93015439 B discloses methods for measuring polynucleotides by hybridizing the single-stranded target to a single-stranded polynucleotide probe tagged with two labels which form an energy transfer pair. The double-stranded hybrid is cleaved between the labels by a restriction enzyme and fluorescence of one of the labels is measured. A disadvantage of this method is that the restriction site in the probe must also be present in the target sequence being detected. S. S. Ghosh, et al. (1994. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3155-3159) describe restriction enzyme catalyzed cleavage of fluorophore-labeled oligonucleotides which are analyzed using fluorescence resonance energy transfer. In these assays, the complementary oligonucleotides are hybridized to produce the double-stranded restriction site, with one of the fluorescent labels linked to each of the two strands.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention employs a signal primer for detection of nucleic acid target sequence amplification. The signal primer of the invention is similar in structure to the signal primer described in US Patent No. 5,547,861 (which is incorporated by reference herein) but it is unlabeled. The detection system further comprises a labeled reporter probe, the 3' end of which hybridizes to the complement of the 5' tail sequence of the signal primer to produce a 5' overhang. The region of the reporter probe which forms the 5' overhang (the reporter moiety) comprises a structure or sequence which is labeled in a manner which permits detection of synthesis of the complement of the overhang. Preferably, the reporter moiety is fluorescently labeled such that fluorescence is quenched prior to extension of the signal primer and synthesis of a complementary strand. The presence of the complement of the reporter moiety, rendering it double-stranded, reduces fluorescence quenching directly and/or allows a subsequent reaction to take place to reduce quenching. In either mechanism, the complement of the labeled structure or sequence leads to an increased distance between the dyes. An associated increase in donor fluorescence or a change in another fluorescence parameter associated with decreased fluorescence quenching can be detected as an indication of amplification of the target sequence.

The 5' tail sequence of the signal primer comprises a sequence which does not hybridize to the target (the adapter sequence). The adapter sequence may be selected such that it is the same in a variety of signal primers which have different 3' target binding sequences (i.e., a "universal" 5' tail sequence). This allows a single reporter probe sequence to be used for detection of any desired target sequence, which is an advantage in that synthesis of the reporter probe is more complex due to the labeling. Further, the invention simplifies the synthesis of the target-specific signal primer. As the signal primer is not labeled, signal primers with different target binding sequences specific for different targets may be more easily and efficiently synthesized.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1A illustrates detection of a nucleic acid target sequence in a Strand Displacement Amplification (SDA) reaction according to the method of the invention. Fig. 1B illustrates the additional reaction steps which may occur when the fluorescently labeled sequence in the reporter probe is a nickable RERS.

Fig. 2 illustrates the results of Example 1.

Fig. 3A and Fig. 3B illustrate the results of Example 2.

Detailed Description of the Invention

Certain terms used herein are defined as follows:

An amplification primer is a primer for amplification of a target sequence by primer extension. For SDA, the 3' end of the amplification primer (the target binding sequence) hybridizes at the 3' end of the target sequence. The amplification primer comprises a recognition site for a restriction endonuclease near its 5' end. The recognition site is for a restriction endonuclease which will cleave one strand of a DNA duplex when the recognition site is hemimodified ("nicking"), as described in US Patent No. 5,455,166; US Patent No. 5,270,184 and EP 0 684 315. As no special sequences or structures are required to drive the amplification reaction, amplification primers for PCR may consist only of target binding sequences. Amplification primers for 3SR and NASBA, in contrast comprise an RNA polymerase promoter near the 5' end. The promoter is appended to the target sequence and serves to drive the amplification reaction by directing transcription of multiple RNA copies of the target.

Extension products are nucleic acids which comprise a primer or a portion of a primer and a newly synthesized strand which is the complement of the sequence downstream of the primer binding site. Extension products result from hybridization of a primer to a template containing a complementary sequence and extension of the primer by polymerase using the template.

The terms target or target sequence refer to nucleic acid sequences to be amplified or detected. These include the original nucleic acid sequence to be amplified, its complementary second strand and either strand of a copy of the original sequence which is produced by replication or amplification. A target sequence may also be referred to as a template for extension of hybridized primers.

A signal primer according to the present invention comprises a 3' target binding sequence which hybridizes to a complementary sequence in the target and further comprises a 5' tail sequence which is not complementary to the target (the adapter sequence). The adapter sequence is selected such that its complementary sequence will hybridize to the 3' end of the reporter probe described below. In some embodiments of the invention the adapter sequence is selected such that its complementary sequence binds to both the 3' end of the reporter probe and to a sequence within the reporter moiety of the reporter probe, as described below. In preferred embodiments of the invention, the signal primer does not comprise a detectable label.

A reporter probe according to the present invention comprises a label which is preferably at least one donor/quencher dye pair, i.e., a fluorescent donor dye and a quencher for the donor fluorophore. The label is linked to a sequence or structure in the reporter probe (the reporter moiety) which does not hybridize directly to the target sequence. The sequence of the reporter probe 3' to the reporter moiety is selected to hybridize to the complement of the signal primer adapter sequence. In

general, the 3' end of the reporter probe does not contain sequences with any significant complementarity to the target sequence. In some instances, however, the reporter probe may contain the sequence that hybridizes to the adapter complement and another short sequence at the 3' end that hybridizes to a short segment of the target complement. In this case, the region of target complementarity is not large enough to permit significant hybridization without concurrent hybridization of the adapter-specific region of the reporter probe. The label of the reporter probe is detected as an indication of the presence of a complement of the reporter moiety which renders it double-stranded, thereby indicating the presence of or the amplification of the target. The 3' terminus of the reporter probe may be capped to prevent extension by polymerase or it may be extendible. Capping may enhance performance by reducing background signal and the nonproductive consumption of reagents in spurious side-reactions resulting from the formation of primer dimers and other errant priming events.

Any nucleic acid sequence or structure which can be labeled such that the presence of its complement, generated according to the methods of the invention, indicates the presence of the target sequence can serve as the reporter moiety of the reporter probe. Preferably, the reporter moiety is labeled with a donor/quencher dye pair such that donor fluorescence is quenched prior to detection of a target and such that quenching of donor fluorescence is reduced as an indication of the presence of the target. The reporter moiety may be a secondary structure at the 5' end of the reporter probe, such as a stem-loop (or hairpin) as described in US Patent No. 5,928,869 or a G-quartet as described in US Patent No. US 5,691,145. The secondary structure is labeled such that the donor and quencher are in close proximity when the secondary structure is folded, resulting in quenching of donor fluorescence. In the presence of target, the secondary structure is unfolded in a target-dependent primer extension reaction so that the distance between the donor and quencher is increased. This decreases quenching and produces an increase in donor fluorescence which can be detected as an indication of the presence of the target sequence. Alternatively, the reporter moiety may be a single-stranded sequence at the 5' end of the reporter probe which is labeled with the donor and quencher in sufficiently close proximity to produce quenching and which contains a single-stranded restriction endonuclease recognition site (RERS) as described in US Patent No. 5,846,726 and US Patent No. 5,919,630. In the single-stranded reporter probe, the RERS is not cleavable. However, in the presence of target, the single-stranded RERS is converted to double-stranded form in a target-dependent primer extension reaction and thereby becomes cleavable. Treatment with the appropriate restriction endonuclease cleaves the RERS between the two dyes, separating them into separate nucleic acid fragments. The associated increase in distance between the dyes results in reduced quenching of donor fluorescence which can be detected as an indication of the presence of the target sequence. In a further embodiment, an RERS reporter moiety may be rendered nickable in the target-dependent primer extension reaction, as taught in US Patent No. 5,846,726 and US Patent

No. 5,919,630. In this embodiment, when the RERS is rendered double-stranded the restriction endonuclease nicks the strand to which the donor and quencher are linked. Polymerase extends from the nick, displacing from the reporter probe a single-stranded fragment linked to one of the dyes. This also increases the distance between the donor and quencher and results in an increase in donor fluorescence due to decreased quenching.

One embodiment of the method of the invention as applied to SDA is illustrated schematically in Fig. 1A. The initial steps of the reaction correspond to the signal primer reaction described in US Patent No. 5,547,861. A signal primer having a 3' target binding sequence (B) and a noncomplementary 5' tail (A) hybridizes to the target downstream from an amplification primer (S_1) (Step 1). As illustrated, the entire hybridization site of the signal primer is downstream from the hybridization site of the amplification primer. However, the hybridization sites of the signal primer and the amplification primer on the target may also partially overlap (typically only by several nucleotides) without significantly affecting the methods of the invention. As used herein, the term "downstream from" with respect to the hybridization sites of the signal primer and the amplification primer on the target is intended to encompass nonoverlapping and partially overlapping sites in the target. Following hybridization to the target, the amplification primer and the signal primer are simultaneously extended on the target sequence, and extension of the amplification primer displaces the single-stranded signal primer extension product (Step 2). The second amplification primer (S_2) hybridizes to the signal primer extension product (Step 3) and both the signal primer extension product and the amplification primer are extended to produce a double-stranded secondary amplification product with a hemimodified RERS at one end (Step 4). In SDA, nicking of the unmodified S_2 strand of the RERS (shown as an arrow in Step 4) and displacement of the strand downstream from the nick produces a single-stranded oligonucleotide which comprises the complement of the signal primer (Step 5). The complement of the signal primer and the double-stranded secondary amplification product are produced only when the target is present and amplified. They may therefore be detected as an indication of target amplification.

In the detection method taught in US Patent No. 5,547,861, the double-stranded secondary amplification product is detected. In contrast, the present invention detects the single-stranded oligonucleotide which is displaced from the double-stranded secondary amplification product after nicking. As this oligonucleotide comprises the complement of the signal primer, the 3' end of the reporter probe hybridizes to it (Step 6). The 5' end of the reporter probe, containing the labeled structure or sequence, forms an overhang with two recessed 3' ends which are appropriate substrates for polymerase. If the reporter probe is not capped to prevent extension, both the reporter probe and the single-stranded oligonucleotide are extended to produce a completely double-stranded molecule (Step 7). If the reporter probe is not extendible, only the recessed 3' end of the single-stranded oligonucleotide (which comprises the complement of the signal primer) is extended and the

product is partially single-stranded and partially double-stranded. In either case, the sequence complementary to the labeled structure or sequence of the reporter probe is synthesized, rendering it double-stranded. Fig. 1A exemplifies the invention using a hairpin reporter moiety labeled with a donor/quencher dye pair such that donor fluorescence is quenched. It will be appreciated from this example that it may not be necessary for the reporter moiety to be rendered entirely double-stranded to be detected. For example, a partial complement of the hairpin structure can be sufficient to keep the arms of the stem from hybridizing to each other. As used herein, "double-stranded reporter moiety" is intended to encompass both fully and partially double-stranded reporter moieties provided they are sufficiently double-stranded to render the reporter moiety detectable. When the reporter moiety is rendered double-stranded in the primer extension reaction, the hairpin is unfolded. Upon unfolding, the two dyes become sufficiently spatially separated to reduce or eliminate quenching of donor fluorescence by the quencher. The resulting increase in donor fluorescence, or a change in another fluorescence parameter associated with a change in fluorescence quenching (such as fluorescence lifetime, fluorescence polarization or a change in emission of the quencher/acceptor dye), may be detected as an indication of amplification of the target sequence. In addition, as illustrated in Fig. 1A, multiple reporter moieties may be combined in a single reporter probe, for example a labeled hairpin may comprise a single-stranded RERS in the single-stranded "loop." In this embodiment synthesis of the complement of the reporter moiety not only unfolds the hairpin to produce an increase in fluorescence, the RERS concurrently becomes cleavable or nickable, generally producing an additional fluorescence increase.

As depicted in Fig. 1A, the folded reporter moiety (e.g., a hairpin) of the reporter probe does not hybridize to the complement of the adapter sequence. However, the adapter sequence may be selected so that its complementary sequence will hybridize to all or part of a folded reporter moiety of the reporter probe. In this case, hybridization alone will unfold or partially unfold the reporter moiety producing signal without the need for polymerase-catalyzed extension following hybridization. The folded reporter moiety in this embodiment may comprise all or part of the reporter probe sequence. In an example of such an embodiment, the reporter probe may be a molecular beacon as described by Tyagi and Kramer, *supra*, in which the loop of the beacon hairpin comprises all or part of the adapter sequence. As the complement of the adapter sequence is synthesized during target amplification, it binds to the molecular beacon and unfolds the structure, producing increased fluorescence. In another embodiment the reporter probe contains a single-stranded sequence 3' to the folded reporter moiety such that both the single-stranded sequence and all or part of the folded reporter moiety hybridize to the sequence complementary to the adapter sequence as it is produced during amplification.

In other alternative embodiments, other reporter moieties may be substituted in the reaction scheme shown in Fig. 1A. For example, other folded nucleic acid structures such as G-quartets may

be substituted and unfolded in a similar target-dependent manner to reduce fluorescence quenching. Alternatively, a specialized linear sequence may be used as the reporter moiety, for example an RERS. When an RERS is used as the reporter moiety the donor and quencher are linked flanking the cleavage site so that when the RERS is rendered double-stranded and cleaved in a target-dependent manner the two dyes are separated onto separate nucleic acid fragments (Step 8, Fig. 1A). These alternative secondary structures may also be combined with specialized sequences, such as an RERS in a G-quartet. The RERS may alternatively be rendered nickable rather than cleavable in its double-stranded form. This is a particularly suitable embodiment for use in SDA, as incorporation of modified nucleotides and production of nickable RERS's are an integral part of the amplification reaction. Generation of a nickable RERS in the reporter probe adds some additional side reactions to the reaction scheme of Fig. 1A (shown in Fig. 1B). Fig. 1B illustrates the reaction if the RERS of the double-stranded molecule illustrated in Step 7 of Fig. 1A is nicked rather than cleaved. Referring to Fig. 1B, as polymerase extends from the nick two products are produced: the double-stranded molecule is regenerated (now carrying only one of the two dyes) and the single-stranded molecule downstream from the nick is displaced (Step 9, carrying the other of the two dyes). The double-stranded molecule can be renicked with displacement of additional single-stranded molecules and the displaced single-stranded molecules hybridize to an amplification primer (Step 10) and be extended to produce a nickable RERS in a fully double-stranded molecule (Steps 11 and 12). Further nicking and displacement produces single-stranded molecules with a partial RERS derived from the previous reporter probe at one end and no label (Step 13). This hybridizes to a new reporter probe (Step 14) and the recessed end becomes extendible as the hairpin breathes and allows the partial RERS to hybridize. Filling-in of the recessed end renders the RERS nickable (Step 15) and the displaced single-stranded molecule re-enters the reaction and the cycle repeats. This amplifies the signal initially produced from a single signal primer/target interaction by means of a separate reaction occurring independently of any further target amplification.

In general, the length of the sequences involved in intermolecular base-pairing between the complement of the adaptor sequence of the signal primer and the reporter probe is not critical. For the signal primer, however, it has been observed that in general the T_m of the target binding sequence has a greater influence on assay efficiency and that longer target binding sequences generally produce more fluorescent signal in the assay. This may be due to the competition between the signal primer and the extension product of the upstream amplification primer for hybridization to the target sequence. The appropriate length for the signal primer and the reporter probe is determined by the number of nucleotides required for stable base-pairing to maintain a partially double-stranded molecule under the selected reaction conditions and is within the ordinary skill in the art. For convenience, the sequences involved in base-pairing are typically between about 8 and 75

nucleotides in length. The maximum length is limited only by practical concerns such as the ease and efficiency of oligonucleotide synthesis and recovery.

Selection of the appropriate concentrations of signal primer and reporter probe in the reaction is also within the ordinary skill in the art. Preferably the concentration of signal primer and reporter probe is relatively high and the concentration of upstream amplification primer is relatively low, as this generally provides higher fluorescent signal generation in the reaction.

A second signal primer which hybridizes to the second, complementary strand of a double-stranded target sequence may optionally be included in the reaction provided that the first and second signal primers do not hybridize to each other. The second signal primer hybridizes to the second strand of the target sequence downstream of the second amplification primer and is extended and displaced by extension of the second amplification primer. The second signal primer extension product is rendered double-stranded by hybridization and extension of the first amplification primer. Generation of the double-stranded labeled structure or sequence and separation of the dye pair proceed as for the first strand of the target sequence. The second signal primer preferably comprises the same 5' adapter sequence as the first signal primer to allow detection of the products of amplification of both target strands with a single reporter probe.

In addition, multiple signal primers per strand of target may be employed if desired, each hybridizing to the target sequence downstream of the other on the same strand, with all signal primers being hybridized downstream of the amplification primer. In this manner, each signal primer is displaced by extension of the upstream detector nucleic acid and the most 5' signal primer is displaced by the amplification primer. Use of multiple signal primers has the advantage of increasing or amplifying the signal generated per target, with an increase in sensitivity of the assay. Again, it is preferable, but not necessary, that all of the signal primers comprise the same 5' adapter sequence to allow detection of all reaction products using a single reporter probe.

Multiple signal primers may also be used to simultaneously detect a plurality of different target sequences. In this case, the 5' adapter sequences of the signal primers are preferably different for each target to be detected. By labeling reporter probes specific for the 5' adapter sequence of each target-specific signal primer with donor/quencher dye pairs which are distinguishable, the presence of each target may be determined by detecting changes in the extent of fluorescence quenching in the reporter probe directed to each target. This embodiment of the invention is particularly useful for detection of single nucleotide sequence variations such as are associated with certain disease states and conditions. The target binding sequence of each signal primer may be selected to be specific for a specific sequence variant of the target. Only those signal primers which comprise the correct target binding sequence for hybridization to the target will hybridize, be extended and result in a complement of the adapter sequence being produced. The reporter probe

specific for that adapter sequence complement will then produce a signal indicating which sequence variant(s) is/are present by virtue of its distinguishing label.

Alternatively, for separate assay of multiple different targets, the same 5' adapter sequence may be used in signal primers directed to the multiple different target sequences. Specificity for the different target sequences is conferred by varying the 3' target binding sequence of the signal primer. This approach not only simplifies the design and synthesis of signal primers, it allows the same reporter probe to be used to detect any desired target sequence. Commercially, this has the advantage that production of only a single reporter probe is necessary to produce assay systems for a variety of targets, thus lowering production costs and simplifying the development of assays for new targets. Further, synthesis of the various signal primers is simplified and less expensive because they do not require labeling.

It will be apparent that, in addition to SDA, the signal primers of the invention may be adapted for use in other primer extension amplification methods (e.g., PCR, 3SR, TMA or NASBA). For example, the methods may be adapted for use in PCR by substituting PCR amplification primers and employing a strand displacing DNA polymerase which lacks 5'→3' exonuclease activity (e.g., Sequencing Grade Taq from Promega or *exo⁻* Vent or *exo⁻* Deep Vent from New England Biolabs) in the PCR. The signal primers hybridize to the target downstream from the PCR amplification primers. They are extended, displaced from the target and rendered double-stranded essentially as described for SDA. The single-stranded oligonucleotide comprising the complement of the signal primer 5' adapter sequence is generated by denaturing the double-stranded secondary amplification product, followed by hybridization of the reporter probe and polymerase extension to synthesize the complementary strand of the labeled reporter moiety in the reporter probe. As in SDA systems, synthesis of the complementary strand either directly or indirectly provides a change in the proximity of donor and quencher dyes and changes the degree of fluorescence quenching. An associated change in a fluorescence parameter, such as intensity, serves as an indication of target amplification.

For adaptation of the inventive methods to 3SR, TMA or NASBA, a 5'→3' exonuclease deficient reverse transcriptase with strand displacing activity is employed, with hybridization of the signal primer to the RNA target downstream of an amplification primer. In a reaction scheme similar to that previously described, the hybridized signal primer is 1) extended, and 2) displaced by extension of the upstream amplification primer. The displaced signal primer extension product is then made entirely double-stranded by hybridization and extension of the second amplification primer which contains an RNA polymerase promoter. The promoter sequence, which is located on the 5' tail of the second amplification primer, is made double-stranded by extension of the 3' end of the signal primer extension product. From the double-stranded promoter, RNA polymerase generates RNA copies complementary to the signal primer extension product. The 3' end of each RNA copy contains a sequence complementary to the adapter sequence of the signal primer. This sequence then

hybridizes to a complementary region of the reporter probe. If the reporter probe is extendible, reverse transcriptase will extend the 3' end of the probe upon the RNA template to produce a reporter probe extension product. RNase H will then degrade the RNA strand of this heteroduplex, freeing the reporter probe extension product to hybridize with the second amplification primer containing the promoter sequence. Conversion of the promoter sequence to the double-stranded form will initiate a new round of RNA synthesis, yielding products that are complementary to the reporter probe extension product, including the full reporter moiety sequence. Hybridization of reporter probes to these RNA targets will cause the reporter moiety to unfold, producing signal as donor and quencher dyes are separated and quenching is reduced. In addition, the reporter probes will be extended upon the RNA target as described above and the cycle will be repeated.

If the reporter probes are not extendible (capped) the adapter sequence of the signal primer must be selected to contain sequences such that the complement of the adapter sequence will hybridize to the reporter moiety of the reporter probe. The reaction will proceed as described above, except that the capped reporter probes will not be extended and the RNA complements of the signal primer extension product will hybridize to the capped reporter probe (including the reporter moiety). Signal will be produced as the reporter moiety unfolds and quenching of donor fluorescence is relieved during hybridization.

For reduced background, it is preferred that the signal primers of the invention be used as described above, with the signal primer extension product being separated from the target sequence by displacement due to extension of the upstream amplification primer. However, it will be apparent that the amplification primers known for use in the various nucleic acid amplification reactions may themselves be used for hybridization of the reporter probe if the primers contain appropriate adapter sequences. In this embodiment, the adapter sequence of an SDA primer is located between the nickable restriction endonuclease site that drives SDA and the target binding sequence. SDA with this primer will produce an amplified product that contains at its 3' end a sequence complementary to the reporter probe. Binding of the reporter probe to this complementary sequence will produce signal as described above. For PCR and NASBA the amplification primers are modified by addition of a noncomplementary 5' tail as described above for the signal primer. In the case of NASBA, the primer lacking the RNA polymerase promoter is the primer modified with the 5' adapter sequence. During PCR and NASBA, complements of the adapter-containing primer extension products are produced as described above for the signal primers. These complementary sequences are made single-stranded either by heat denaturation (PCR) or enzymatic digestion of RNA template (RNase H in NASBA), and the single-stranded complement then binds to reporter probe as described above for signal primers. The use of amplification primers as signal primers eliminates the need for the additional signal primer in the reaction, but because background may be higher in this embodiment the sensitivity of the assay may be decreased.

In other alternative embodiments, the signal primers of the invention may be used in non-amplification based assay formats to detect target sequences. In a first non-target amplification embodiment, the 3' single-stranded target binding sequence of the signal primer hybridizes to the 3' end of the target sequence such that the 5' adapter sequence forms a 5' overhang. The target sequence functions as a primer for synthesis of a strand complementary to the signal primer using a polymerase to extend the target sequence using the 5' overhang as a template. If the target binding sequence of the signal primer hybridizes to only a portion of the target sequence, the target sequence also forms a 5' overhang and the signal primer may be similarly extended using the 5' overhang of the target as a template. Alternatively, the signal primer may be non-extendible as synthesis of a copy of the target sequence is not required in this embodiment of the invention. In either case, the complement of the adapter sequence of the signal primer is synthesized. Upon separation of the two strands, the complement of the signal primer adapter sequence in the target will hybridize to the 3' end of the reporter probe, rendering the labeled reporter moiety double-stranded upon polymerase extension of the recessed 3' end of the adapter sequence complement. An advantage of this embodiment over the reaction described in US Patent No. 5,855,336 is that use of the overhang allows synthesis of the complement of the adapter sequence in a single extension step rather than two. That is, the complement of the adapter sequence is appended directly to the original target, thus allowing target detection without requiring amplification. In a second preferred non-target amplification embodiment of the invention the signal primer is hybridized to an internal sequence of the target with an additional primer hybridized upstream to displace it (commonly referred to as a "bumper" primer). The signal primer and bumper primer are extended such that the signal primer extension product is displaced from the target sequence. A second pair of primers are hybridized to the extension product and extended such that the downstream primer extension product contains the complement of the adapter sequence and is displaced from the signal primer extension product by extension of its bumper primer. The reporter probe hybridizes to the complement of the adapter sequence and the adapter sequence is extended as described herein to synthesize the complement of the reporter moiety. Because this is an isothermal reaction which depends on strand displacement to separate complementary strands, extension of the first bumper primer renders the target double-stranded and unable to participate in any further reaction steps. Although a copy is generated and displaced, this is not considered target amplification because the copy represents a subsequence of the original target which is detected as an indication of the presence of the target and only one copy of the subsequence is generated per original target sequence.

The foregoing disclosure primarily relates to preferred embodiments in which the reporter moiety is labeled with a fluorescent donor/quencher dye pair and synthesis of the complement of the reporter moiety is detected by an increase in fluorescence. This label system allows synthesis of the complement to be detected in real-time and/or in a homogeneous assay (i.e., without separation of

the label prior to detection). However, other labels useful in the invention will be apparent to those skilled in the art. For example, a single fluorescent label may be employed on the reporter moiety with detection of a change in fluorescence polarization in the presence of the complement of the reporter moiety (see US Patent No. 5,593,867). Non-fluorescent labels are also useful. For example, the reporter moiety may be labeled with a lipophilic dye and contain a restriction site which is cleaved in the presence of the complement of the reporter moiety (see US Patent No. 5,550,025). Alternatively, the reporter probe may be radiolabeled and the products resulting from synthesis of the complement of the reporter moiety may be resolved by electrophoresis and visualized by autoradiography. Immunological labels may also be employed. A reporter probe labeled with a hapten can be detected after synthesis of the complement of the reporter moiety by first removing unreacted reporter probe (for example by adapter-specific capture on a solid phase) and then detecting the hapten label on the reacted reporter probe using standard chemiluminescent or colorimetric ELISAs. A biotin label may be substituted for the hapten and detected using methods known in the art.

The label indicating the presence of the complement of the reporter moiety may be detected at a selected endpoint in the reaction. However, because oligonucleotides with increased distance between the donor and the quencher are produced concurrently with hybridization and primer extension, the label may also be monitored as the reaction is occurring, i.e., in "real-time". This homogeneous, real-time assay format can be used to provide semi-quantitative or quantitative information about the initial amount of target present. For example, the rate at which the label (e.g., fluorescence intensity) changes during the reaction (either as part of target amplification or in non-amplification detection methods) is an indication of initial target levels. As a result, when more initial copies of the target sequence are present, the label more rapidly reaches a selected threshold value (i.e., shorter time to positivity). In addition, the rate of change in the label during the course of the reaction is more rapid in samples containing higher initial amounts of target than in samples containing lower initial amounts of target. These or other measurements as are known in the art may be made as an indication of the presence of target or as an indication of target amplification. The initial amount of target is typically determined by comparison of the experimental results to results for known amounts of target.

Many donor/quencher dye pairs known in the art are useful in preferred embodiments of the present invention. These include, for example, fluorescein isothiocyanate (FITC)/tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC), FITC/Texas Red™ (Molecular Probes), FITC/N-hydroxysuccinimidyl 1-pyrenebutyrate (PY3), FITC/eosin isothiocyanate (EITC), N-hydroxysuccinimidyl 1-pyrenesulfonate (PYS)/FITC, FITC/Rhodamine X, FITC/tetramethylrhodamine (TAMRA), and others. The selection of a particular donor/quencher pair is not critical. For energy transfer quenching mechanisms it is only necessary that the emission wavelengths of the donor

fluorophore overlap the excitation wavelengths of the quencher, i.e., there must be sufficient spectral overlap between the two dyes to allow efficient energy transfer, charge transfer or fluorescence quenching. P-(dimethyl aminophenylazo) benzoic acid (DABCYL) is a non-fluorescent quencher dye which effectively quenches fluorescence from an adjacent fluorophore, e.g., fluorescein or 5-(2'-aminoethyl) aminonaphthalene (EDANS). Certain donor/quencher pairs are exemplified above and in the following examples, however, others will be apparent to those skilled in the art and are also useful in the invention. Any dye pair which produces fluorescence quenching in the reporter probes of the invention are suitable for use in the methods of the invention, regardless of the mechanism by which quenching occurs. Terminal and internal labeling methods are also known in the art and may be routinely used to link the donor and quencher dyes at their respective sites in the reporter probe.

EXAMPLE 1

Strand Displacement Amplification reactions containing signal primers according to the invention were run essentially as described in US Patent No. 5,547,861 for detection of a synthetic target sequence. A first reaction contained 10^6 copies of the target sequence, SDA amplification primers appropriate for amplification of the synthetic target sequence, 100 nm of a signal primer according to the invention comprising a target binding sequence specific for the target and a 5' tail sequence identical to the 3' sequence of a reporter probe, and 200 nm of the reporter probe. The sequence of the reporter probe contained an RERS in the 5' region flanked by fluorescein and Rhodamine X (Rox) such that fluorescence of fluorescein was quenched when the RERS was intact. The sequences of the signal primer and reporter probe (shown in the 5' to 3' direction) are shown below. The target binding sequence is shown in *italics*, the 5' adapter sequence of the signal primer and the identical 3' sequence of the reporter probe are underlined and the RERS of the reporter probe is bolded.

Signal Primer (SEQ ID NO:1):

CCAAAATGACAGCTTCTGATGGAATGACTCACTGAGTTGGAACGT

Reporter Probe (SEQ ID NO:2):

(fluorescein)TACCTOGAG**T**(rox)GCACCCAAAAGACAGCTTCTGATGGAA

A second reaction contained no target and the same signal primer as in the first reaction. A third reaction was a control reaction which contained only 10^6 copies of target and the reporter probe (i.e., no signal primer). Fluorescein fluorescence was detected in real-time during the amplification reactions. As shown in Fig. 2, donor fluorescence remained low and constant in the absence of target, indicating quenching of fluorescence throughout the reaction due failure of the RERS of the reporter

probe to be converted to double-stranded form and cleaved. In the absence of signal primer donor fluorescence also remained quenched throughout the amplification reaction. In the presence of target, signal primer and reporter probe, however, donor fluorescence was initially low but increased during the time course of the amplification reaction as the RERS of the reporter probe was converted to double-stranded form and cleaved to reduce the extent of fluorescence quenching. These results demonstrate that the signal primers and reporter probes of the invention can be used to detect a nucleic acid target sequence by monitoring changes in the extent of fluorescence quenching.

In a similar experiment, 0 and 250 copies of cloned HIV target DNA were detected using a variety of signal primers in combination with one of two reporter probes, each having the same sequence but labeled with different donor/quencher dye pairs. The sequences of the signal primers and reporter probes are shown in the 5' to 3' direction below. The target binding sequence is shown in *italics*, the 5' adapter sequence of the signal primer and the identical 3' sequence of the reporter probe are underlined and the RERS of the reporter probe is **bolded**.

Signal Primers:

GAAAGACGTTAGCCACCATAACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATTGTG (SEQ ID NO:3, UA1)
GAAAGACGTTAGCCACCATAACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATTGTGGATG (SEQ ID NO:4, UA2)
GAAAGACGTTAGCCACCATAACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATT (S:Q ID NO:5, UA3)
GAAAGACGTTAGCCACCATAACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATTG (SEQ ID NO:6, UA3.1)
ACGTTAGCCACCATAACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATTGTG (SEQ ID NO:7, UA4)
ACGTTAGCCACCATAACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATTGTGGATG (SEQ ID NO:8, UA5)
ACGTTAGCCACCATAACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATT (SEQ ID NO:9, UA6)
ACGTTAGCCACCATAACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATTG (SEQ ID NO:10, UA6.1)
AGCCACCAACACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATTGTG (S:Q ID NO:11, UA7)
AGCCACCAACACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATTGTGGATG (SEQ ID NO:12, UA8)
AGCCACCAACACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATT (SEQ ID NO:13, UA9)
AGCCACCAACACGGATACCCCTTTTCTTTTAAATTG (SEQ ID NO:14, UA9.1)

Reporter Probes (SEQ ID NO:15)

(fluorescein)TGCCCGAGT(dabcyl)GAAAGACGTTAGCCACCATAACGGAT
(fluorescein)TGCCCGAGT(rox)GAAAGACGTTAGCCACCATAACGGAT

The signal primers differed in length and T_m of the target binding sequence and of the reporter binding sequence. Fluorescein fluorescence was monitored during amplification. To compare the reporter probe/signal primer combinations, results were expressed as the area under the fluorescence curve or "MOTA". The more area under the curve, the more fluorescence generated by a particular reporter probe/signal primer combination and the more efficient the detection of amplified products. Both reporter probes worked well in combination with all signal primers for detection of the

HIV target, although performance was generally not as good as for reporter probes containing hairpin reporter moieties. However, linear reporter probes such as these are shorter than reporter probes containing secondary structures and are therefore easier to synthesize with higher yield. Higher MOA values were obtained using the fluorescein-dabcyl reporter probe, suggesting that this dye pair may have a higher quenching efficiency.

EXAMPLE 2

SDA reactions were prepared to contain the different signal primers shown in Example 1, either 0 or 5,000 copies of the cloned HIV target, and a reporter probe. The sequence of the reporter probe was as follows:

(dabcyl)TAGTGCCCGAGCACT(rox)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT (SEQ ID NO:16, TBD9)

SEQ ID NO:16 contains a BsoBI RERS in the single-stranded loop of a hairpin structure at the 5' end. The SDA reactions contained 500 nM SDA amplification primers, 50 nM bumper primers, and 200 nM each signal primers and reporter probes. Rhodamine fluorescence was monitored during amplification. For each signal primer/reporter probe combination rhodamine fluorescence increased in the presence of target during the amplification reaction. In the absence of target rhodamine fluorescence remained low throughout the reaction. The results of one of the reactions are shown in Fig. 3A, for signal primer SEQ ID NO:3, with the multiple curves representing replicate samples. Results indicated that the length and T_m of the adapter sequence did not significantly affect assay performance. However, the T_m of the target binding sequence of the signal primer influenced signal generation, with signal primers comprising longer target binding sequences performing better than those with shorter target binding sequences.

The experiment was repeated using three different reporter probes, including SEQ ID NO:16. The additional reporter probes were as follows:

(fluorescein)TAGTGCCCGAGCACT(dabcyl)ACGTTAGCCACCATACGGAT (SEQ ID NO:17, TBD10)

(fluorescein)TAGTGCCCGAGCACT(dabcyl)AGCCACCAACACGGAT (SEQ ID NO:18, TBD11)

In this experiment the concentration of the upstream amplification primer was reduced to 100 nM. Amplification was performed in the presence of either 0 or 250 copies of target DNA. Reactions containing target showed a rapid increase in fluorescein fluorescence after as little as 5 min. of incubation. In contrast, reactions without target exhibited low fluorescein fluorescence throughout

the reaction period. Results for a reaction containing SEQ ID NO:9 and SEQ ID NO:17 are shown in Fig. 3B, with the multiple curves representing replicate samples. The reporter probe/signal primer combinations SEQ ID NO:16/SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:17/SEQ ID NO:8 produced similar MOTA values (62,147 and 66,051 respectively), whereas the SEQ ID NO:18/SEQ ID NO:12 combination was less efficient (MOTA = 49,8/9) suggesting less efficient hybridization and conversion due to the shorter probe and primer length.

EXAMPLE 3

In this experiment a reporter probe comprising a hairpin and a nickable rather than cleavable BsoBI RERS was tested in SDA. The reporter probe had the following sequence (SEQ ID NO:19, TBD13.1):

(fluorescein)TAGTGCTCGGGCACT(dabcyl)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

This reporter probe was used with SEQ ID NO:4 as the signal primer in the amplification reaction. A mean MOTA value of 48,000 was obtained in the presence of 250 copies of HIV target DNA, compared with a score of less than 150 from negative controls. The lower MOTA score observed as compared to reporter probe SEQ ID NO:16, which has the same 3' tail sequence may be due to inefficient priming of the polymerase off the short oligonucleotide that is left after nicking of the BsoBI site. Performance of the reaction may be enhanced by increasing the length of the hairpin to stabilize this oligonucleotide and provide a larger region for binding of the polymerase.

EXAMPLE 4

In this experiment SDA was performed using a reporter probe containing a G-quartet structure and an RERS as the reporter moiety. This reporter probe had the following sequence (SEQ ID NO:20, TBD14):

(fluorescein)GGTTGGCTGGAGGTTGGT(dabcyl)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

An increase in fluorescein fluorescence was observed during the course of amplification of 250 copies of HIV target DNA. No such increase in fluorescence was observed in the absence of target.

SEQUENCE LISTING

<110> Nadeau, James G.
 Hellyer, Tobin J.
 5 <120> Probes and Methods for Detection of Nucleic Acids
 <130> Universal Reporter
 10 <140>
 <141>
 <160> 20
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 45
 <212> DNA
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
 sequence for experimental model
 25 <400> 1
 ccaaaatgac agottctgat ggaatgactc actgagttgg aacgt 45
 30 <210> 2
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
 sequence for experimental model
 <400> 2
 40 tacctcgagt gcagccaaaa gacagcttct gatggaa 37
 <210> 3
 <211> 48
 45 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 3
 50 gaaagacgtt agccaccata cggatacccc tttcttttta aaattgtg 48
 <210> 4
 <211> 52
 <212> DNA
 55 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 4
 60 gaaagacgtt agccaccata cggatacccc tttcttttta aaattgtgga tg 52

<210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 5 <400> 5
 gaaagacgtt agccaccata cggatacccc ttttctttta aaatt 45

10 <210> 6
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 15 <400> 6
 gaaagacgtt agccaccata cggatacccc ttttctttta aaattg 46

20 <210> 7
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 25 <400> 7
 acggttagcca ccatacggat accccttttc ttttaaaatt gtg 43

30 <210> 8
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 35 <400> 8
 acggttagcca ccatacggat accccttttc ttttaaaatt gtggatg 47

40 <210> 9
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 45 <400> 9
 acggttagcca ccatacggat accccttttc ttttaaaatt 40

50 <210> 10
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 55 <400> 10
 acggttagcca ccatacggat accccttttc ttttaaaatt g 41

60 <210> 11
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 60 <400> 11

```

agccaccata cggataccccc ttttctttta aaattgtg          38

5  <210> 12
   <211> 42
   <212> DNA
   <213> Human immunodeficiency virus

10 <400> 12
    agccaccata cggataccccc ttttctttta aaattgtgga tg    42

   <210> 13
   <211> 35
15 <212> DNA
   <213> Human immunodeficiency virus

   <400> 13
20 agccaccata cggataccccc ttttctttta aaatt          35

   <210> 14
   <211> 36
25 <212> DNA
   <213> Human immunodeficiency virus

   <400> 14
    agccaccata cggataccccc ttttctttta aaattg          36

30 <210> 15
   <211> 34
   <212> DNA
   <213> Human immunodeficiency virus

35 <400> 15
    tgcccgagtg aaagacgtta gccaccatac ggat          34

40 <210> 16
   <211> 40
   <212> DNA
   <213> Human immunodeficiency virus

45 <400> 16
    tagtgcccga gcactgaag acgttagcca ccatacggat        40

   <210> 17
50 <211> 35
   <212> DNA
   <213> Human immunodeficiency virus

   <400> 17
55 tagtgcccga gcactacgtt agccaccata cggat          35

   <210> 18
60 <211> 30
   <212> DNA

```


<213> Human immunodeficiency virus

<400> 18
tagtgccgga gcactagcca ccatacggat 30

5

<210> 19
<211> 40
<212> DNA

10 <213> Human immunodeficiency virus

<400> 19
tagtgctcgg gcactgaaag acgttagcca ccatacggat 40

15

<210> 20
<211> 43
<212> DNA

20 <213> Human immunodeficiency virus

<400> 20
ggttggctcg aggttggtga aagacgttag ccaccatacg gat 43

25

FIG. 1A

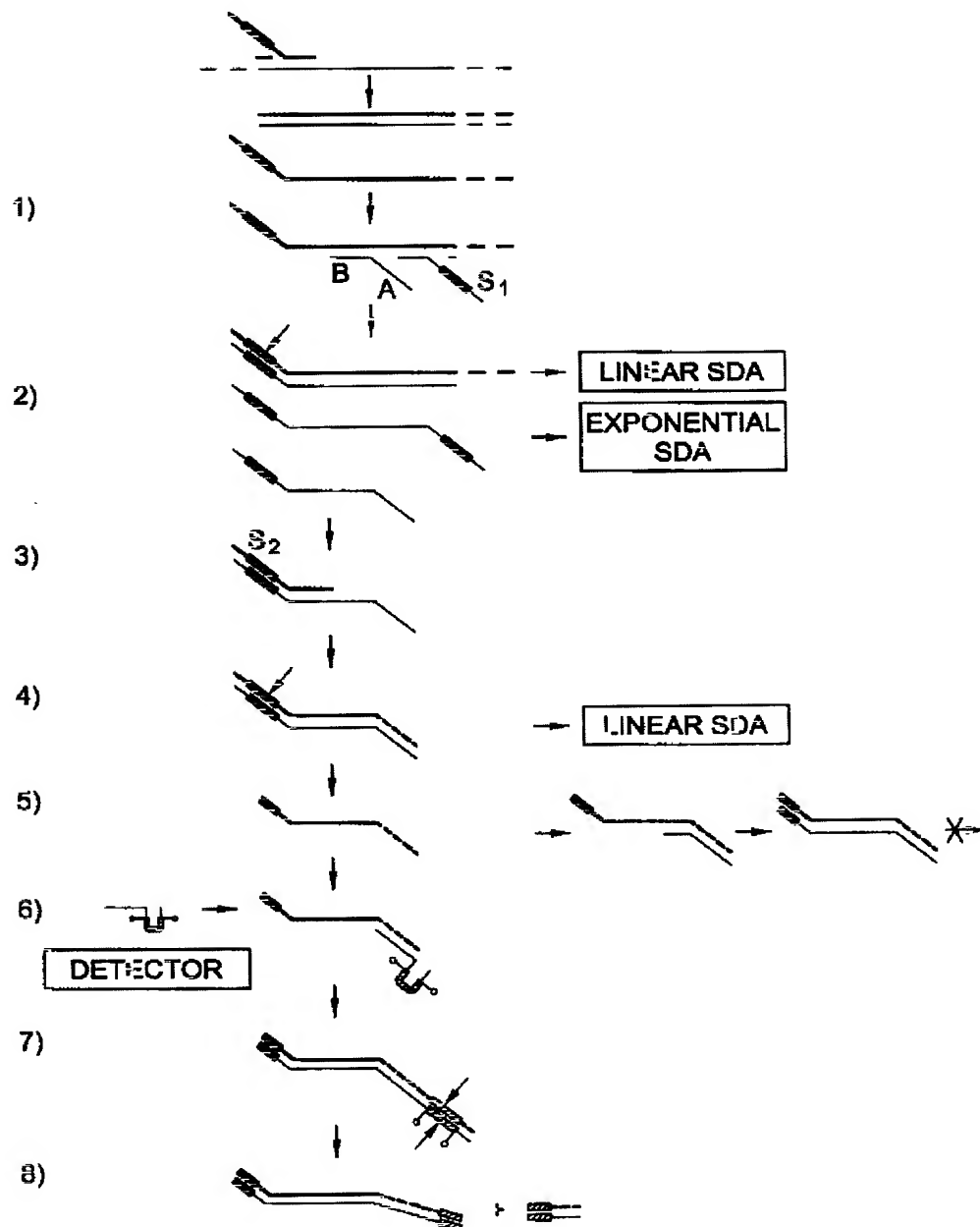


FIG. 1B

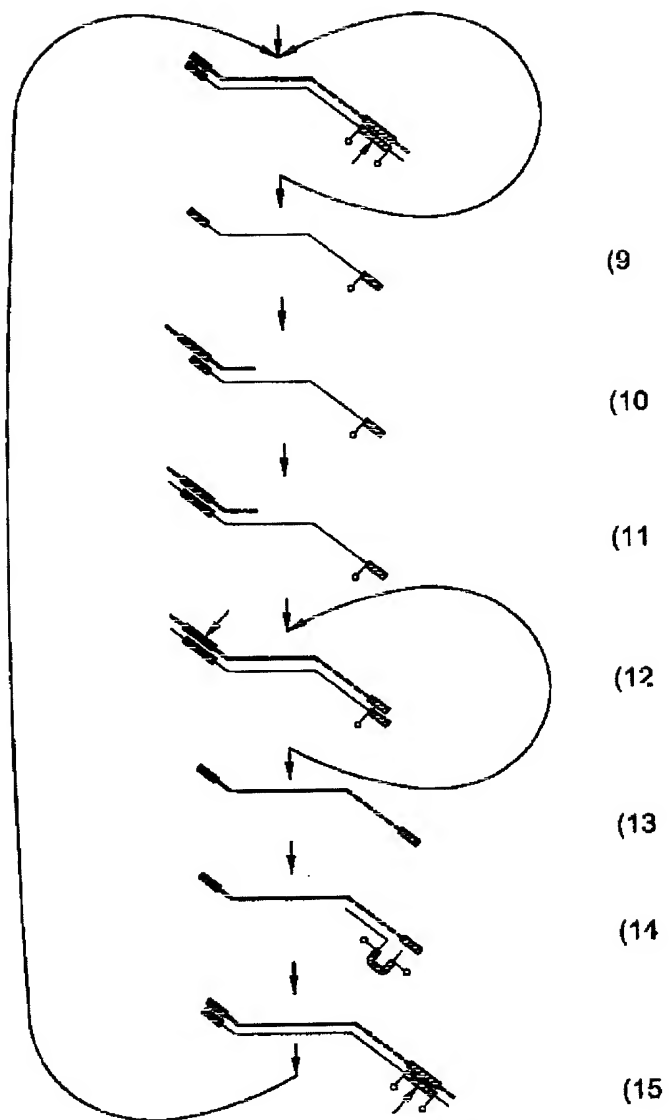


FIG. 2

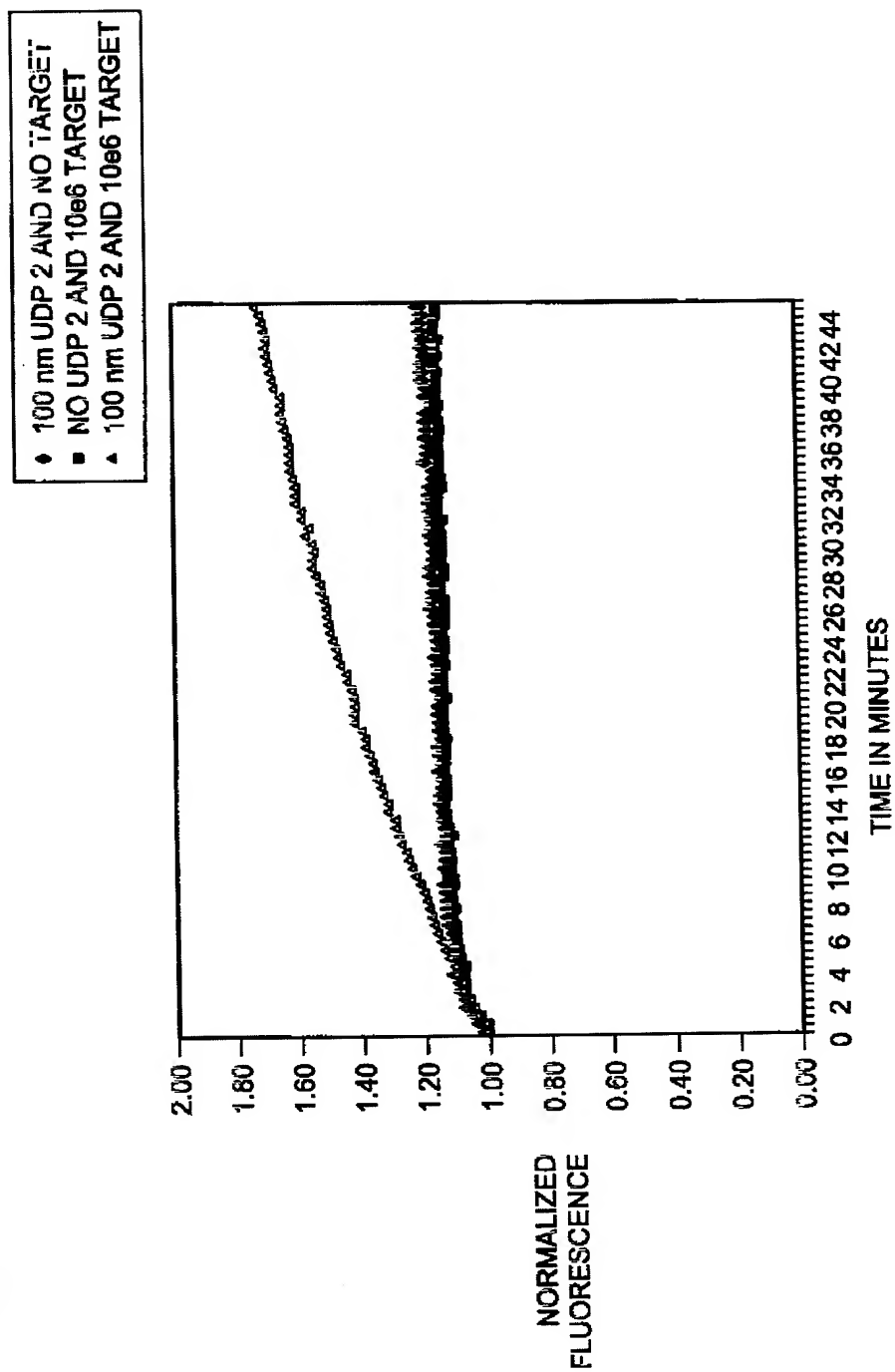


FIG. 3A

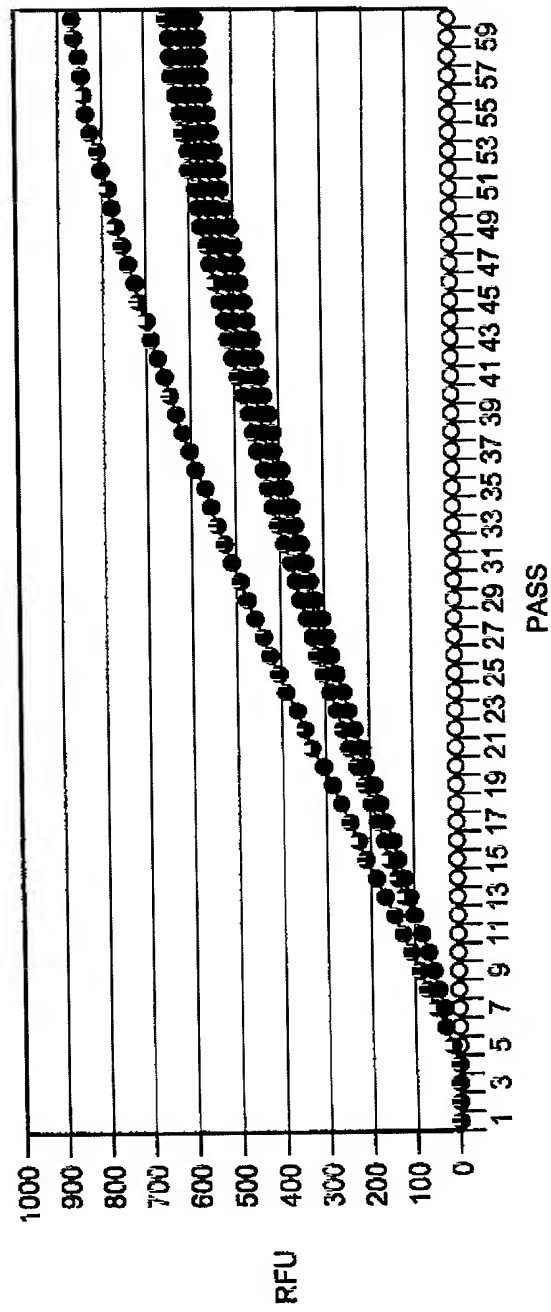
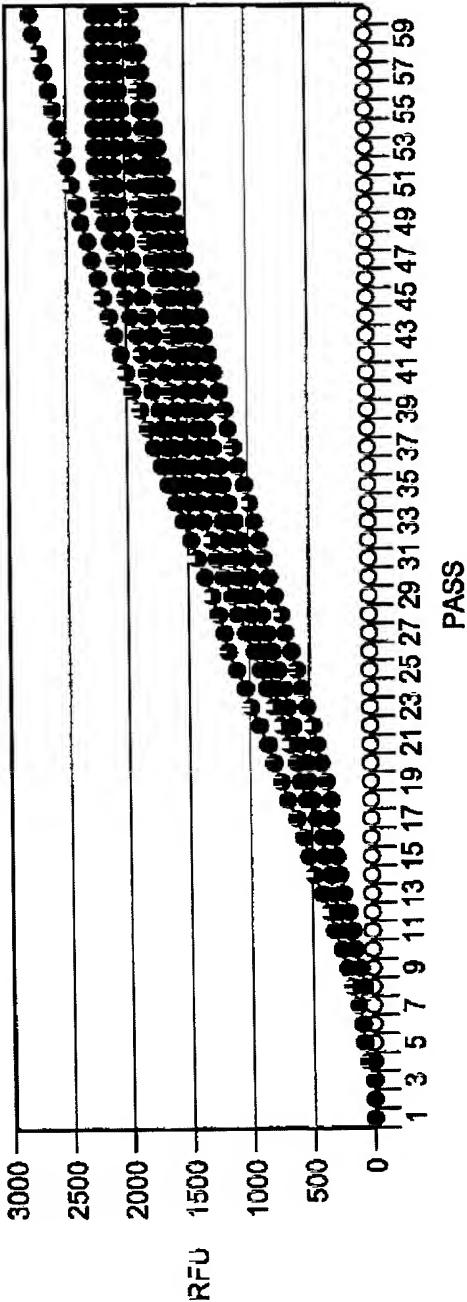


FIG. 3B



ABSTRACT

The invention employs an unlabeled signal primer comprising a 5' adaptor sequence for detection of nucleic acid target sequences. The detection system further comprises a reporter probe, the 3' end of which hybridizes to the complement of the 5' adaptor sequence of the signal primer to produce a 5' overhang. Polymerase is used to fill in the overhang and synthesize the complement of the 5' overhang of the reporter probe. Synthesis of the reporter probe complement is detected, either directly or indirectly, as an indication of the presence of the target.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-45192
(P2002-45192A)

(43) 公開日 平成14年2月12日 (2002.2.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	デマコト [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数12 O L 外国語出願 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2001-173341(P2001-173341)

(22) 出願日 平成13年6月8日 (2001.6.8)

(31) 優先権主張番号 09/590061

(32) 優先日 平成12年6月8日 (2000.6.8)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 59511/091

ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー

BECTON, DICKINSON AND COMPANY

アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー

07417-1880 フランクリン・レイクス

ベクトン・ドライブ 1

(74) 代理人 100099623

弁理士 奥山 尚一 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸を検出するためのプローブおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、核酸標的配列を検出するための5'側アダプター配列を含む未標識シグナルプライマーを使用する。検出システムは、その3'側末端がシグナルプライマーの5'側アダプター配列の相補鎖にハイブリダイゼーションして5'側の突出した末端を作製するレポータープローブをさらに含む。ポリメラーゼは突出した末端に充填し、レポータープローブの5'側の突出した末端の相補鎖を合成するために使用される。レポータープローブ相補鎖の合成を直接的または間接的に標的の存在を示すものとして検出する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 標的配列に、アダプター配列を含むシグナルプライマーをハイブリダイゼーションすることによって、アダプター配列の相補鎖を作製するステップと、

b) 該アダプター配列の相補鎖に、レポーター部分を含むレポータープローブをハイブリダイゼーションすることによって、2本鎖レポーター部分を作製するステップと、

c) 該標的配列の存在を示すものとして、該レポーター部分の該相補鎖の合成を検出するステップとを含む核酸標的配列の検出方法。

【請求項2】 前記アダプター配列の前記相補鎖に前記レポーター部分をハイブリダイゼーションした結果、前記2本鎖レポーター部分が作製される請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記レポーター部分の前記相補鎖の合成の結果、前記2本鎖レポーター部分が作製される請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記アダプター配列の前記相補鎖が、標的の増幅と同時に合成される請求項1に記載の方法。

【請求項5】 増幅反応において、

a) 標的配列に、アダプター配列を含むシグナルプライマーをハイブリダイゼーションするステップと、

b) 該標的配列上で該シグナルプライマーを伸長して伸長産物を作成するステップと、

c) 該伸長産物に増幅プライマーをハイブリダイゼーションし、該増幅プライマーを伸長して、該アダプター配列の相補鎖を合成するステップと、

d) 該アダプター配列の該相補鎖にレポーター部分を含むレポータープローブをハイブリダイゼーションすることによって、2本鎖レポーター部分を作製するステップと、

e) 該標的配列の増幅を示すものとして、該2本鎖レポーター部分を検出するステップとを含む標的配列の増幅の検出方法。

【請求項6】 前記アダプター配列の前記相補鎖に前記レポーター部分をハイブリダイゼーションした結果、前記2本鎖レポーター部分が作製される請求項5に記載の方法。

【請求項7】 a) アダプター配列が5'側の突出した末端を作製するように、標的配列に、該アダプター配列を含むシグナルプライマーをハイブリダイゼーションするステップと、

b) 該ハイブリダイゼーションされた標的配列の伸長によって該アダプター配列の相補鎖をハイブリダイゼーションするステップと、

c) 該アダプター配列の該相補鎖に、レポーター部分を含むレポータープローブをハイブリダイゼーションすることによって、2本鎖レポーター部分を作製するステッ

プと、

d) 該標的配列の存在を示すものとして、該2本鎖レポーター部分を検出するステップとを含む核酸標的配列の検出方法。

【請求項8】 前記アダプター配列の前記相補鎖に前記レポーター部分をハイブリダイゼーションした結果、前記2本鎖レポーター部分が作製される請求項7に記載の方法。

【請求項9】 a) 3'側標的結合配列と5'側アダプター配列とを有する単一のオリゴヌクレオチドを含む未標識シグナルプライマーと、

b) 5'側レポーター部分と、アダプター配列と実質的に同一である3'側配列とを含むレポータープローブとを含む標的配列を検出するためのオリゴヌクレオチド類のセット。

【請求項10】 第一のシグナルプライマーのアダプター配列と実質的に同一であるアダプター配列を有する第二のシグナルプライマーをさらに含む請求項9に記載のオリゴヌクレオチド類のセット。

【請求項11】 第一のシグナルプライマーのアダプター配列と異なるアダプター配列を有する第二のシグナルプライマーをさらに含む請求項9に記載のオリゴヌクレオチド類のセット。

【請求項12】 前記レポーター部分が標識された請求項9に記載のオリゴヌクレオチド類のセット。

【発明の詳細な説明】

【0001】 [発明の分野] 本発明は、核酸標的配列を検出するための材料と方法とに関する。

【0002】 [発明の背景] 標識されたオリゴヌクレオチドの配列特異的なハイブリダイゼーションは、選択されたヌクレオチド配列を検出して識別するための手段として長い間使用されている。このようなプローブを蛍光標識で標識することはプローブハイブリダイゼーションの検出を容易にするための比較的感度の良い、非放射性の手段を提供している。最近開発された検出方法は、プローブハイブリダイゼーションを検出するために、蛍光強度の直接検出ではなく蛍光エネルギー移動(FET)の過程を使用する。蛍光エネルギー移動は、一方(消光剤)の吸収スペクトルが他方(ドナー)の発光スペクトルと重なり、2つの色素(dye)が非常に近い位置にある場合に、ドナー蛍光団と(蛍光団であっても、蛍光団でなくてもよい)消光色素との間で生ずる。これらの特性を有する色素は、ドナー/消光剤色素対またはエネルギー移動色素対と呼ばれる。ドナー蛍光団の励起状態のエネルギーは、隣接する消光剤との共鳴双極子誘導性双極子相互作用によって移動する。消光剤(「アクセプター」とも呼ばれる)も蛍光団である場合には、その蛍光強度が増強される場合もある。エネルギー移動効率(ドナーと消光剤との距離に大きく依存し、これらの関係を予測する等式はForster(1948, Ann. Phys. 2, 55-75)に

よって展開されている。エネルギー移動効率50%であるドナーと消光剤色素との距離はForster距離(R_0)と呼ばれる。蛍光消光の他の機序は、例えば、電荷移動および衝突消光を含むことも知られている。これらの場合には、消光剤は蛍光色素であってもよいが、必ずしもその必要はない。FETに基づくものではない蛍光消光機序は、典型的には、消光剤の吸収スペクトルとドナー蛍光団の発光スペクトルとのある程度の重なりを必要としない。

【0003】消光を生じるために近接した2つの色素の相互作用を使用するエネルギー移動および他の機序は、均一方式で実施することができるアッセイなど、ヌクレオチド配列を検出または識別するための魅力的な手段である。均一アッセイ方式は、単一の蛍光標識の蛍光の検出を使用する従来のプローブハイブリダイゼーションアッセイより簡単である。その理由は、異質アッセイは、一般に、遊離標識からハイブリダイゼーションした標識を分離する追加のステップを必要とするからである。典型的には、FETおよびこれに関連する方法は、2つの相補的なオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって行われるとき、一方または両方の色素標識の蛍光特性変化をモニタリングする。この方式では、蛍光特性の変化は、典型的には、色素のうちの一つの蛍光強度の増加として示されるように、エネルギー移動量の変化または蛍光消光量の変化として測定することができる。ハイブリダイゼーションは、一方がドナー蛍光団で標識され、他方が消光剤で標識された2つの別個の相補的オリゴヌクレオチド間で生じうる。2本鎖形態では、1本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、ドナー蛍光が減少し（ますます消光する）および/またはエネルギー移動が増加する。FETハイブリダイゼーションアッセイのいくつかの方式は、Nonisotopic DNA Probe Techniques(1992. Academic Press, Inc., pgs. 311-352)に考察されている。あるいは、オリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーションされない場合とオリゴヌクレオチドがその相補鎖にハイブリダイゼーションされる場合とにおいて、一方または両方の蛍光特性の検出可能な差が生ずるように、ドナーおよび消光剤を1つのオリゴヌクレオチドに結合することができる。この方式では、オリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーションされる場合には、ドナー蛍光は典型的には増加し、エネルギー移動/消光は減少する。例えば、ドナーおよび消光色素で標識したオリゴヌクレオチドは、塩基対を形成して、エネルギー移動および消光が生じてよい、2つの色素を空間的に近接して有するヘアピンを形成する自己相補的(self-complementary)配列を含有してもよい。第二のオリゴヌクレオチドの相補鎖へのこのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションはヘアピンを妨害し、2つの色素間の距離を増加させ、それによって消光しにくくする。TyagiおよびKramer(1996. Nature Biotech. 14, 303-308)およびB. B.

agwell, et al.(1994. Nucl. Acids Res. 22, 2424-2425; 米国特許第5,607,834号)を参照。核酸増幅を検出するための蛍光消光のエネルギー移動または他の機序を使用する均一アッセイ方法も記載されている。L. G. Lee, et al. (1993. Nuc. Acids Res. 21, 3761-3766)は、二重標識したディテクタープローブがPCR中に標的増幅特異的な様式で切断されるリアルタイムでの検出方法を開示している。ディテクタープローブは、Taqポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性がディテクタープローブを消化して、エネルギー移動対を形成する2つの蛍光色素を分離するように、増幅プライマーの下流にハイブリダイゼーションされる。プローブが切断されると蛍光強度が増加する。

【0004】増幅プライマーのハイブリダイゼーション部位の下流の標的配列にハイブリダイゼーションするシグナルプライマー（ディテクタープローブと呼ばれることもある）は核酸増幅の均一検出のためのものとして記載されてきた（引用することにより本明細書の一部をなすものとする米国特許第5,547,861号）。シグナルプライマーは、増幅プライマーの伸長と同様の様式でポリメラーゼによって伸長される。増幅プライマーの伸長は、標的増幅依存的な様式でシグナルプライマーの伸長産物と置換して、標的増幅を示すものとして検出することができる2本鎖の二次的な増幅産物を作製する。1本鎖シグナルプライマーを使用する均一検出方法の例は、米国特許第5,550,025号（親油性色素および制限部位の導入）および米国特許第5,593,867号（蛍光偏向検出）に記載されている。さらに最近では、二次構造物のアンフォールディングを使用するFET方法を使用して、核酸標的を検出するためにシグナルプライマーが適用されている（米国特許第5,691,145号および米国特許第5,928,869号を参照）。ドナー/消光色素で標識した部分的1本鎖、部分的2本鎖のシグナルプライマーについても最近では記載されている。例えば、米国特許第5,846,726号は、ドナー/消光色素対が1本鎖制限エンドヌクレアーゼ認識部位に隣接するシグナルを開示している。標的が存在する場合には、制限部位は2本鎖になり、制限エンドヌクレアーゼによって切断される。切断することにより色素対が分離されて、ドナー消光が減少する。

【0005】米国特許第5,866,336号は、PCRにおいて増幅プライマーに蛍光標識したヘアピンを使用することを記載している。ヘアピンプライマーの3'側末端は、第二のプライマーによって標的に付加される非標的配列の相補鎖にハイブリダイゼーションする。このシステムでは、ヘアピンプライマーは標的配列の増幅の必須部分をなし、伸長可能でなければならない。一方、本発明では、レポータープローブは標的配列の増幅に関与しないが、標的増幅と同時に生じる別個の系列の反応段階においてシグナルを形成するので、レポータープローブは必ずしも伸長可能でなくてもよい。さらにまた、本発明の

シグナルプライマーは標的の内部配列(すなわち、増幅プライマー間)にハイブリダイゼーションするので、シグナル形成反応は標的の部分配列(subsequence)を検出するが、増幅産物自体を検出しない。

【0006】標的配列を検出する他の蛍光消光方法は、1本鎖制限部位を含有するプローブの1本鎖標的への直接的なハイブリダイゼーションによって作製される制限部位の切断を使用する。日本国特許第93015439B号は、エネルギー移動対を形成する2つの標識を標識した1本鎖ポリヌクレオチドプローブに1本鎖標的をハイブリダイゼーションすることによって、ポリヌクレオチドを測定する方法を開示している。2本鎖ハイブリッドは制限酵素によって標識の間で切断され、標識の一方の蛍光が測定される。この方法の欠点は、プローブの制限部位も検出される標的配列内に存在しなければならないことである。S. S. Ghosh, et al. (1994. Nucl. Acids Res. 22, 3155-3159)は、蛍光共鳴エネルギー移動を使用して分析される蛍光団標識オリゴヌクレオチドの制限酵素触媒切断について記載している。これらのアッセイでは、相補的なオリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーションして、2本鎖制限部位を作製し、蛍光標識の一方は2本鎖の各々に結合する。

【0007】[発明の開示] 本発明は、核酸標的配列増幅を検出するためのシグナルプライマーを使用する。本発明のシグナルプライマーは、米国特許第5,547,861号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)に記載されているシグナルプライマーと構造が類似しているが、未標識である。検出系は、その3'側末端がシグナルプライマーの5'側末端配列の相補鎖にハイブリダイゼーションして5'側に突出した末端(overhung)を作製する標識レポータープローブをさらに含む。5'側の突出した末端(レポーター部分)を形成するレポータープローブ領域は、突出した末端の相補鎖の合成の検出を可能にする様式で標識される構造または配列を含む。好ましくは、シグナルプライマーの伸長および相補鎖の合成の前に蛍光が消光されるように、レポーター部分が蛍光標識される。2本鎖にされるレポーター部分の相補鎖の存在は、蛍光消光を直接低減させ、および/またはその後の反応により消光を少なくするようにする。どちらの機序でも、標識された構造または配列の相補鎖により色素間の距離が増加する。ドナーの蛍光に関連する増加または蛍光消光の低下に関連する別の蛍光パラメータの変化は、標的配列の増幅を示すものとして検出することができる。

【0008】シグナルプライマーの5'側配列は、標的(アダプター配列)にハイブリダイゼーションしない配列を含む。アダプター配列は、異なる3'側標的結合配列を有する種々のシグナルプライマーにおいて同一であるように選択することができる(すなわち、「普遍的な」5'側末端配列)。これにより、1つのレポータープローブ

配列を、任意の望ましい標的配列を検出するために使用することができる。これは、標識のためのレポータープローブの合成がさらに複雑であるという点において有利である。さらに、本発明は標的特異的シグナルプライマーの合成を単純にする。シグナルプライマーを標識しないので、異なる標的に特異的な、異なる標的結合配列を有するシグナルプライマーをより容易に且つ効率的に合成することができる。

【0009】本明細書において使用する用語は以下のとおりである。

【0010】増幅プライマーとは、プライマー伸長による標的配列の増幅のためのプライマーである。SDAでは、増幅プライマー(標的結合配列)の3'側末端は標的配列の3'側末端にハイブリダイゼーションする。増幅プライマーは、5'側末端付近に制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含む。米国特許第5,455,166号、米国特許第5,270,184号および欧州特許第0 684 315号に記載されているように、認識部位が半改変(hemimodified)(「ニックング」)される場合には、認識部位は、DNA2本鎖の1ストランドを切断する制限エンドヌクレアーゼのためのものである。増幅反応を駆動するために特定の配列または構造は必要ではないので、PCRの増幅プライマーは標的結合配列だけであってもよい。一方、3SRおよびNASBAの増幅プライマーは、5'側末端付近にRNAポリメラーゼプロモーターを含む。このプロモーターは標的配列に追加され、標的の多数のRNAコピーの転写を指示することによって、増幅反応を駆動する働きをする。

【0011】伸長産物は、プライマーまたはプライマーの一部およびプライマー結合部位の下流の配列の相補鎖である新たに合成された鎖を含む。伸長産物は、相補的配列を含有する鋳型へのプライマーのハイブリダイゼーションおよび鋳型を使用したポリメラーゼによるプライマーの伸長により生ずる。

【0012】標的または標的配列という用語は、増幅されるまたは検出される核酸配列をいう。これらには、増幅されるオリジナルの核酸配列、その相補的な第二の鎖および複製または増幅によって作製されるオリジナルの配列のコピーのどちらかの鎖が含まれる。標的配列は、ハイブリダイゼーションされるプライマーを伸長するための鋳型と呼ばれることもある。

【0013】本発明によるシグナルプライマーは、標的の相補的配列にハイブリダイゼーションする3'側標的結合配列を含み、標的(アダプター配列)に相補的でない5'側末端配列をさらに含む。アダプター配列は、その相補的配列が以下に記載するようにレポータープローブの3'側末端にハイブリダイゼーションするように選択される。本発明のいくつかの態様において、アダプター配列は、以下に記載するように、その相補的配列がレポータープローブの3'側末端とレポータープローブのレポーター部分内の配列に結合するように選択される。本発明の

好ましい態様において、シグナルプライマーは検出可能な標識を含まない。

【0014】本発明によるレポータープローブは、好ましくは、少なくとも1つのドナー/消光色素対、すなわち蛍光ドナー色素およびドナー蛍光団の消光剤である標識を含む。標識は、標的配列に直接ハイブリダイゼーションしないレポータープローブの配列または構造（レポーター部分）に結合する。レポータープローブのレポーター部分の3'側の配列は、シグナルプライマーアダプター配列の相補鎖にハイブリダイゼーションするように選択される。一般に、レポータープローブの3'側末端は、標的配列との相補性のある配列を含有しない。しかし、レポータープローブが、アダプター相補鎖にハイブリダイゼーションする配列および標的相補鎖の短いセグメントにハイブリダイゼーションする3'側末端の別の短い配列を含有する場合もある。この場合には、標的相補鎖の領域は、レポータープローブのアダプター特異的領域が同時にハイブリダイゼーションされることなく、ハイブリダイゼーションを可能にするほど大きくない。レポータープローブの標識は、2本鎖にすることによって、標的の存在または標的の増幅を示すレポーター部分の相補鎖の存在を示すものとして検出される。レポータープローブの3'側末端はポリメラーゼによる伸長を防止するようにキャップ形成されても、または伸長可能であってもよい。キャップ形成は、バックグラウンドシグナルと、プライマーダイマーの形成および他の誤ったプライミング事象により生じる偽の副反応における試薬の非生産的な消費とを低下させることによって性能を増強しうる。

【0015】本発明の方法により作製される、相補鎖の存在が標的配列の存在を示すように標識することができる任意の核酸配列または構造は、レポータープローブのレポーター部分として働くことができる。好ましくは、ドナーの蛍光が標的の検出の前に消光され、標的の存在を示すものとしてドナーの蛍光の消光が低下されるように、レポーター部分はドナー/消光色素対で標識される。レポーター部分は、米国特許第5,928,869号に記載されているステム-ループ（またはヘアピン）または米国特許第5,691,145号に記載されているG-カルテット（G-quartet）などの、レポータープローブの5'側末端の二次構造であってもよい。二次構造が折りたたまれたときにドナーと消光剤が近い位置に存在して、ドナーの蛍光が消光するように、二次構造を標識する。標的が存在する場合に、二次構造は、ドナーと消光剤の間の距離が増加するように、標的依存性プライマー伸長反応においてときほぐされる。これは消光を減少させ、標的配列の存在を示すものとして検出することができるドナーの蛍光の増加を生ずる。または、レポーター部分は、消光を引き起こすのに十分に近い位置に存在するドナーおよび消光剤で標識され、米国特許第5,846,726号および米国特許第5,919,630号に記載されている1本鎖制限エンドヌクレ

アーゼ認識部位（RERS）を含有するレポータープローブの5'側末端の1本鎖配列であってもよい。1本鎖レポータープローブでは、RERSは切断可能ではない。しかし、標的が存在する場合には、1本鎖RERSは、標的依存性プライマー伸長反応において2本鎖形態に変換され、それによって切断可能になる。適当な制限エンドヌクレアーゼによる処理は2つの色素間のRERSを切断し、それらを別個の核酸断片に分離する。色素間の距離が関連して増加することにより、標的配列の存在を示すものとして検出できるドナーの蛍光の消光が低下する。さらに別の実施態様において、米国特許第5,846,726号および米国特許第5,919,630号に教示されているように、標的依存的なプライマー伸長反応において、RERSをニックング可能にすることができる。この実施態様では、RERSが2本鎖にされる場合には、制限エンドヌクレアーゼは、ドナーおよび消光剤が結合する鎖に切れ目を入れる（nick）。ポリメラーゼは切れ目（nick）から伸長し、レポータープローブから、色素の一方に結合した1本鎖断片を置換する。これはまた、ドナーと消光剤の距離を増加し、消光の減少により、ドナーの蛍光が増加する。

【0016】SDAに適用される本発明の方法の一実施態様を図1Aに略図で例示する。反応の最初のステップは、米国特許第5,547,861号に記載されているシグナルプライマー反応に相当する。3'側標的結合配列（B）および非相補的な5'側末端（A）を有するシグナルプライマーが増幅プライマー（ S_1 ）の下流の標的にハイブリダイゼーションする（ステップ1）。図1Aに示すように、シグナルプライマーのハイブリダイゼーション部位全体が増幅プライマーのハイブリダイゼーション部位の下流にある。しかし、標的のシグナルプライマーのハイブリダイゼーション部位と増幅プライマーのハイブリダイゼーション部位は、本発明の方法に大きな影響を与えることなく、部分的に（典型的に数ヌクレオチド）重なってもよい。本明細書において使用する、標的のシグナルプライマーおよび増幅プライマーのハイブリダイゼーション部位に対して「下流」という用語は、標的の重ならない部位および部分的に重なる部位を含むことが意図される。標的へのハイブリダイゼーション後に、増幅プライマーおよびシグナルプライマーは標的配列上で同時に伸長され、増幅プライマーの伸長は1本鎖シグナルプライマー伸長産物を置換する（ステップ2）。第二の増幅プライマー（ S_2 ）はシグナルプライマー伸長産物にハイブリダイゼーションし（ステップ3）、シグナルプライマー伸長産物および増幅プライマーが共に伸長されて、一方の末端に半改変された（hemimodified）RERSを有する2本鎖二次増幅産物を作製する。SDAでは、RERSの未改変 S_2 鎖のニックング（ステップ4において矢印で示す）およびニックの下流の鎖の置換が、シグナルプライマーの相補鎖を含む1本鎖オリゴヌクレオチドを作製する（ステップ5）。シグナルプライマーの相補鎖および2本鎖二次増幅産物

は、標的が存在して増幅される場合にのみ作製される。従って、それらは標的増幅を示すものとして検出することができる。

【0017】米国特許第5,547,861号に教示される検出方法では、2本鎖二次増幅産物が検出される。一方、本発明は、ニッキング後に2本鎖二次増幅産物から置換される1本鎖オリゴヌクレオチドを検出する。このオリゴヌクレオチドはシグナルプライマーの相補鎖を含むので、レポータープロープの3'側末端がそれにハイブリダイゼーションする(ステップ6)。標識された構造または配列を含有するレポータープロープの5'側末端は、ポリメラーゼの適当な基質である2つのヘコンだ3'側末端を有するオリゴヌクレオチドを形成する。レポータープロープが伸長を防止するようにキャッピングされない場合には、レポータープロープおよび1本鎖オリゴヌクレオチドは共に伸長されて完全な2本鎖分子を作製する(ステップ7)。レポータープロープが伸長可能でない場合には、(シグナルプライマーの相補鎖を含む)1本鎖オリゴヌクレオチドのヘコンだ3'側末端だけが伸長され、産物は一部1本鎖で、一部2本鎖である。どちらの場合も、レポータープロープの標識された構造または配列に相補的な配列が合成され、それを2本鎖にする。図1Aは、ドナー蛍光が消光されるようにドナー/消光色素対で標識されたヘアピンレポーター部分を使用した本発明を例示する。レポーター部分は2本鎖全体を検出されるようにする必要がないことがこの例から考えられる。例えば、ヘアピン構造の部分的な相補鎖は、ステムのアームが互いにハイブリダイゼーションしないようにするのに十分となりうる。本明細書において使用される、「2本鎖レポーター部分」は、完全および部分的2本鎖レポーター部分を含むが、ただしそれらはレポーター部分を検出可能にするのに十分な2本鎖であることを意図している。レポーター部分がプライマー伸長反応において2本鎖にされる場合には、ヘアピンが巻き戻される。巻き戻される結果、2つの色素は、消光剤によるドナー蛍光の消光を低減させまたは除去するのに十分に間隔をおいて分離される。その結果生ずるドナー蛍光の増加または蛍光消光の変化に関連する別の蛍光パラメータ(蛍光寿命、蛍光局在化または消光剤/アクセプター色素の発光の変化)を標的配列の増幅を示すものとして検出することができる。また、図1Aに示すように、多数のレポーター部分を1つのレポータープロープ中で組み合わせることができ、例えば標識されたヘアピンは1本鎖「ループ」に1本鎖RERSを含むことができる。この実施態様では、レポーター部分の相補鎖の合成はヘアピンを巻き戻して蛍光の増加を生じさせるだけでなく、RERSは同時に切断可能またはニッキング可能になり、一般に追加の蛍光の増加を生じる。

【0018】図1Aに図示するように、レポータープロープの折りたたまれたレポーター部分(例えば、ヘアピ

ン)はアダプター配列の相補鎖にハイブリダイゼーションしない。しかし、アダプター配列は、相補的配列がレポータープロープの折りたたまれたレポーター部分の全てまたは一部にハイブリダイゼーションするように選択することができる。この場合では、ハイブリダイゼーション後にポリメラーゼ触媒伸長を必要とすることなく、ハイブリダイゼーションだけで、レポーター部分を全体的または部分的に巻き戻す。この実施態様の折りたたまれたレポーター部分はレポータープロープ配列の全体または一部を含むことができる。このような実施態様の例において、レポータープロープは、Tyagi and Kramer、上記によって記載される分子標識(molecular beacon)であってもよく、標識ヘアピン(beacon hairpin)のループはアダプター配列の全てまたは一部を含む。アダプター配列の相補鎖は標的増幅中に合成されるので、それは分子標識(molecular beacon)に結合して、その構造を巻き戻し、蛍光を増加させる。別の実施態様において、増幅中に作製されるとき、1本鎖配列および折りたたまれたレポーター部分の全てまたは一部がアダプター配列に相補的な配列にハイブリダイゼーションするように、レポータープロープは折りたたまれたレポーター部分の3'側に1本鎖配列を含有する。

【0019】他の別の実施態様では、他のレポーター部分は図1Aに示す反応スキームにおいて置換することができる。例えば、G-カルテット(G-quartets)などの他の折りたたまれた核酸構造は、蛍光消光を減少させるのと同様の標的依存性の様式で置換され、巻き戻すことができる。または、特殊化された線状配列を、例えばRERSのようなレポーター部分として使用することができる。RERSがレポーター部分として使用される場合には、ドナーおよび消光剤は切断部位に隣接して結合される。その結果RERSが2本鎖にされ、標的依存性の様式で切断されたとき、2つの色素は別個の核酸断片に分離される(ステップ8、図1A)。これらの別の二次構造も、G-カルテット(G-quartets)のRERSなどの特殊化された配列と組み合わせることができる。あるいは、RERSは、2本鎖形態では切断可能ではなく、ニッキング可能であってもよい。改変されたヌクレオチドの導入およびニッキング可能なRERS'sの作製は増幅反応の必須部分であるため、これは、SDAに使用するための特に好適な実施態様である。レポータープロープ内でのニッキング可能なRERSの作製は図1Aの反応スキームに追加の副反応を加える(図1Bに示す)。図1Bは、図1Aのステップ7に例示する2本鎖分子のRERSが切断されるのではなく、ニッキングされる場合の反応を例示する。図1Bを参照すると、ポリメラーゼがニッキング部位から伸長すると、2つの産物が作製される。すなわち、2本鎖分子が再生され(ここでは2つの色素の一方だけを保有する)、ニッキング部位の下流の1本鎖分子が置換される(ステップ9、2つの色素のうちの他方を保有する)。2本鎖分子は再度ニッキングされ

て、別の1本鎖分子が置換され、置換された1本鎖分子が増幅プライマーにハイブリダイゼーションし（ステップ10）、伸長されて、完全な2本鎖分子においてニッキング可能なRERSを作製することができる（ステップ11および12）。さらなるニッキングおよび置換は、一方の末端に以前のレポータープローブ由来の部分的RERSを有し、標識を持たない1本鎖分子を作製する（ステップ13）。これは新たなレポータープローブにハイブリダイゼーションし（ステップ14）、ヘアピンがブリーディングするとき、へこんだ末端が伸長可能になり、部分的RERSをハイブリダイゼーションさせる。へこんだ末端を埋める（filling-in）とRERSがニッキング可能になり（ステップ15）、置換された1本鎖分子は反応に再度加わり、サイクルが反復する。これは、任意の別の標的増幅とは独立して生ずる別個の反応によって、1つのシグナルプライマー/標的相互作用から最初に生じるシグナルを増幅する。

【0020】一般に、シグナルプライマーのアダプター配列の相補鎖とレポータープローブとの間の分子間塩基対形成に関与する配列の鎖長は重大ではない。しかし、シグナルプライマーでは、一般に、標的結合配列の T_m はアッセイ効率により大きい影響を与えること、およびアッセイにおいてより長い標的結合配列は一般により蛍光の強いシグナルを形成することが観察されている。これは、シグナルプライマーと標的配列にハイブリダイゼーションするための上流の増幅プライマーの伸長産物との間の競合による場合がある。シグナルプライマーおよびレポータープローブの適当な鎖長は、選択した反応条件下において部分的な2本鎖分子を維持するための安定な塩基対形成に必要なヌクレオチドの数によって決定され、当該技術の範囲内である。簡便にするために、塩基対形成に関与する配列は、典型的には、鎖長が約8〜75ヌクレオチドである。最大の鎖長は、オリゴヌクレオチド合成および回収の容易さおよび効率などの実際の重要性によってのみ限定される。

【0021】反応におけるシグナルプライマーおよびレポータープローブの適当な濃度の選択も当該技術の範囲内である。好ましくは、シグナルプライマーおよびレポータープローブの濃度は比較的高く、上流の増幅プライマーの濃度は比較的低い。その理由は、このようにすることで一般に反応において比較的大きい蛍光シグナルを形成するからである。

【0022】2本鎖標的配列の第二の相補鎖にハイブリダイゼーションする第二のシグナルプライマーを、必要に応じて、反応に加えることができるが、ただし、第一および第二のシグナルプライマーは互いにハイブリダイゼーションしない。第二のシグナルプライマーは第二の増幅プライマーの下流の標的配列の第二の鎖にハイブリダイゼーションし、伸長されて、第二の増幅プライマーの伸長によって置換される。第二のシグナルプライマー

伸長産物は、第一の増幅プライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長により2本鎖とされる。2本鎖標識構造または配列の形成および色素対の分離は、標的配列の第一の鎖と同様に進行する。第二のシグナルプライマーは、好ましくは、第一のシグナルプライマーと同一の5'側アダプター配列を含み、1つのレポータープローブによる両方の標的鎖の増幅産物の検出を可能にする。

【0023】これに加え、必要がある場合には、標的のストランドあたり複数のシグナルプライマーを使用することができ、各々同じストランドの他方の下流の標的配列にハイブリダイゼーションし、全てのシグナルプライマーは増幅プライマーの下流にハイブリダイゼーションされる。このように、各シグナルプライマーは上流のディテクター核酸の伸長によって置換され、ほとんどの5'側のシグナルプライマーは増幅プライマーによって置換される。複数のシグナルプライマーを使用することは1つの標的あたりに形成されるシグナルを増加または増幅する利点を有し、アッセイ感度を増加させる。また、1つのレポータープローブを使用して、全ての反応産物の検出を可能にするために、シグナルプライマーの全てが同じ5'側アダプター配列を含むことは好ましいが、必要なことではない。

【0024】複数の異なる標的配列を同時に検出するために、多数のシグナルプライマーを使用することもできる。この場合では、シグナルプライマーの5'側アダプター配列は、好ましくは、検出される各標的について異なる。各標的的特異的シグナルプライマーの5'側アダプター配列に特異的なレポータープローブを識別可能なドナー/消光色素対で標識することによって、各標的に向けられるレポータープローブの蛍光消光の程度の変化を検出することによって、あるいは各標的の存在を測定することができる。本発明のこの実施態様は、ある種の疾患状態および状態に関連するものなどの1つのヌクレオチド配列変種を検出するのに特に有用である。各シグナルプライマーの標的結合配列は、標的の特定の配列変種に特異的であるように選択することができる。標的にハイブリダイゼーションするための適切な標的結合配列を含むシグナルプライマーだけがハイブリダイゼーションし、伸長されて、アダプター配列の相補鎖が作製される。次いで、そのアダプター配列の相補鎖に特異的なレポータープローブが、どの配列変種が識別用標識により存在するかを示すシグナルを形成する。

【0025】これに対し、多数の異なる標的を別個にアッセイするために、同じ5'側アダプター配列を多数の異なる標的配列に向けるシグナルプライマーに使用することができる。異なる標的配列の特異性は、シグナルプライマーの3'側標的結合配列を変更することによって与えられる。この方法は、シグナルプライマーの設計および合成を簡単にするだけでなく、任意の望ましい標的配列を検出するために同じレポータープローブの使用を可能

にする。商業的には、これは、種々の標的のためのアッセイ系を作製するために1つだけのレポータープローブを必要とし、それによって製造費用を削減し、新規標的のアッセイの開発を単純化するという利点を有する。さらに、それらは標識化を必要としないので、種々のシグナルプライマーの合成が単純化され、低費用になる。

【0026】SDA以外に、本発明のシグナルプライマーを他のプライマー伸長増幅方法（例えば、PCR、3SR、TMAまたはNASBA）に使用するために適合することができることが明らかである。例えば、PCRにおいて、PCR増幅プライマーを置換し、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を欠損するストランド置換DNAポリメラーゼ（例えば、Promega製のシーケンシンググレードTaqまたはNew England Biolabs製のexo-Ventもしくはexo-Deep Vent）を使用することによって本発明の方法をPCRに使用するために適用することができる。シグナルプライマーは、PCR増幅プライマーの下流の標的にハイブリダイゼーションする。それらは、本質的にSDAについて記載したように、伸長され、標的から置換され、2本鎖にされる。シグナルプライマー5'側アダプター配列の相補鎖を含む1本鎖オリゴヌクレオチドは、2本鎖二次増幅産物を変性し、次いでレポータープローブをハイブリダイゼーションし、レポータープローブの標識されたレポーター部分の相補鎖を合成するためのポリメラーゼ伸長によって作製される。SDAシステムと同様に、相補鎖の合成はドナーおよび消光色素の距離を変化させ、蛍光消光の程度を変化させる。強度などの蛍光パラメータの関連する変化は標的増幅を示すものとして働く。

【0027】本発明の方法を3SR、TMAまたはNASBAに適用するためには、鎖置換活性を有する5'-3'エキソヌクレアーゼ欠損逆転写酵素を使用し、増幅プライマーの下流のRNA標的にシグナルプライマーをハイブリダイゼーションする。以前に記載したものと同様の反応スキームでは、ハイブリダイゼーションされるシグナルプライマーは、1)伸長され、2)上流の増幅プライマーの伸長によって置換される。次いで、RNAポリメラーゼプロモーターを含有する第二の増幅プライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長によって、置換されたシグナルプライマー伸長産物を全体的に2本鎖にする。シグナルプライマー伸長産物の3'側末端を伸長することによって、第二の増幅プライマーの5'側末端に位置するプロモーター配列を2本鎖にする。2本鎖プロモーターから、RNAポリメラーゼは、シグナルプライマー伸長産物に相補的なRNAコピーを作製する。各RNAコピーの3'側末端は、シグナルプライマーのアダプター配列に相補的な配列を含有する。次いで、この配列は、レポータープローブの相補的領域にハイブリダイゼーションする。レポータープローブが伸長可能である場合には、逆転写酵素はRNA鋳型に対してプローブの3'側末端を伸長して、レポータープローブ伸長産物を作製する。次いで、RNase Hはこのヘテ

ロ2本鎖のRNA鎖を分解して、プロモーター配列を含有する第二の増幅プライマーとハイブリダイゼーションするレポータープローブ伸長産物を遊離する。2本鎖形態へのプロモーター配列の変換は新たなラウンドのRNA合成を開始し、レポーター部分配列全長を含むレポータープローブ伸長産物に相補的である産物を産生する。レポータープローブのこれらのRNA標的へのハイブリダイゼーションはレポーター部分を巻き戻させ、ドナーおよび消光色素が分離され、消光が低減するとシグナルを形成する。また、上記のように、レポータープローブがRNA標的上で伸長され、サイクルが反復される。

【0028】レポータープローブが伸長可能でない（キャップされている）場合には、シグナルプライマーのアダプター配列は、アダプター配列の相補鎖がレポータープローブのレポーター部分にハイブリダイゼーションするように、配列を含有するよう選択されなければならない。反応は、キャップされたレポータープローブが伸長されず、シグナルプライマー伸長産物のRNA相補鎖がキャップされたレポータープローブ（レポーター部分を含む）にハイブリダイゼーションすることを除いて、上記のように進行する。レポーター部分が巻き戻るとシグナルが形成され、ドナー蛍光の消光はハイブリダイゼーション中に軽減される。

【0029】バックグラウンドを低くするためには、本発明のシグナルプライマーが上記のように使用され、シグナルプライマー伸長産物が、上流の増幅プライマーの伸長により置換されることによって標的配列から分離されることが好ましい。しかし、プライマーが適当なアダプター配列を含有する場合には、種々の核酸増幅反応に使用するために周知の増幅プライマーをレポータープローブのハイブリダイゼーションに使用することができることが明らかである。この実施態様では、SDAプライマーのアダプター配列は、SDAを駆動するニッキング可能な制限エンドヌクレアーゼ部位と標的結合配列の間に位置する。このプライマーを有するSDAは、レポータープローブに相補的な3'側末端配列に含有する増幅された産物を作製する。この相補的配列へのレポータープローブの結合は上記のようにシグナルを形成する。PCRおよびNASBAのためには、シグナルプライマーについて上記した非相補的5'側末端を付加することによって増幅プライマーを改変する。NASBAの場合には、RNAポリメラーゼプロモーターを欠損するプライマーは5'側アダプター配列で改変されたプライマーである。PCRおよびNASBA中、アダプター含有プライマー伸長産物の相補鎖はシグナルプライマーについて上記したように作成される。これらの相補的な配列は、熱変性（PCR）またはRNA鋳型の酵素消化（NASBAのRNase H）によって1本鎖にされ、1本鎖相補鎖は次いで、シグナルプライマーについて上記したようにレポータープローブに結合する。シグナルプライマーとしての増幅プライマーを使用すると、反応に追加のシグ

ナルプライマーの必要がなくなるが、この実施態様ではバックグラウンドが高くなる場合があるので、アッセイの感度は低下することがある。

【0030】他の別の実施態様では、本発明のシグナルプライマーを、標的配列を検出する非増幅系アッセイ方式に使用することができる。第一の非標的増幅実施態様では、5'側アダプター配列が5'側の突出した末端を形成するように、シグナルプライマーの3'側1本鎖標的結合配列は標的配列の3'側末端にハイブリダイゼーションする。標的配列は、鋳型として5'側の突出した末端を使用して標的配列を伸長するためにポリメラーゼを使用し、シグナルプライマーに相補的なストランドを合成するためのプライマーとして機能する。シグナルプライマーの標的結合配列が標的配列の一部だけにハイブリダイゼーションする場合には、標的配列も5'側の突出した末端を形成し、シグナルプライマーは鋳型として標的の5'側の突出した末端を使用して同様に伸長される。または、標的配列のコピーの合成は本発明のこの実施態様では必要ないので、シグナルプライマーは伸長可能でなくともよい。どちらの場合も、シグナルプライマーのアダプター配列の相補鎖が合成される。2つの鎖が分離される結果、標的のシグナルプライマーアダプター配列の相補鎖はレポータープローブの3'側末端にハイブリダイゼーションし、アダプター配列相補鎖のへこんだ3'側末端のポリメラーゼ伸長の結果、標識したレポーター部分を2本鎖にする。米国特許第5,866,336号に記載されている反応を上回るこの実施態様の利点は、突出した末端を使用することにより、2つステップではなく1つの伸長ステップにおいてアダプター配列の相補鎖の合成を可能にすることである。すなわち、アダプター配列の相補鎖は元の標的に直接追加され、それによって増幅する必要なく標的の検出を可能にする。本発明の第二の好ましい非標的増幅実施態様では、シグナルプライマーは標的の内部配列にハイブリダイゼーションされ、追加のプライマーが上流にハイブリダイゼーションし、それと置換する（通常、「バンパー（bumper）」プライマーと呼ばれる）。シグナルプライマーおよびバンパープライマーは、シグナルプライマー伸長産物が標的配列から置換されるように伸長される。下流のプライマー伸長産物がアダプター配列の相補鎖を含有し、バンパープライマーの伸長によってシグナルプライマー伸長産物から置換されるように、第二のプライマー対が伸長産物にハイブリダイゼーションされ、伸長される。レポータープローブはアダプター配列の相補鎖にハイブリダイゼーションし、レポーター部分の相補鎖を合成するために本明細書に記載するようにアダプター配列は伸長される。これは、相補鎖を分離するためにストランド置換に依存する等温反応であるので、第一のバンパープライマーの伸長は標的を2本鎖にし、任意のさらなる反応ステップに関与不可能にする。コピーが作製され、置換されるが、コピー

は、標的の存在を示すものとして検出される元の標的のサブ配列であり、サブ配列の1コピーだけが元の標的配列あたり作製されるので、これは標的増幅と考えられない。

【0031】前述の開示は、レポーター部分が蛍光ドナー/消光色素対で標識され、レポーター部分の相補鎖の合成は蛍光の増加によって検出される好ましい実施態様に主に関する。この標識系により相補鎖の合成はリアルタイムおよび/または均一アッセイ（すなわち、検出の前に標識を分離しない）で検出することができる。しかし、本発明に有用な他の標識は当業者に明らかである。例えば、1つの蛍光標識はレポーター部分に使用することができ、レポーター部分の相補鎖が存在する場合には蛍光局在化の変化が検出される（米国特許第5,593,867号）。非蛍光標識も有用である。例えば、レポーター部分は親油性色素で標識することができ、レポーター部分の相補鎖が存在する場合には切断される制限部分を含有する（米国特許第5,550,025号参照）。または、レポータープローブは放射性標識されてもよく、レポーター部分の相補鎖の合成によって生ずる産物は電気泳動によって分離され、オートラジオグラフィーによって可視化することができる。免疫学的標識を使用することもできる。最初に未反応のレポータープローブを除去することにより（例えば、固相のアダプター特異的捕獲）、次いで標準的な化学発光または比色ELISAsを使用して、反応したレポータープローブのハプテン標識を検出することにより、レポーター部分の相補鎖の合成の後に、ハプテンで標識したレポータープローブを検出することができる。ビオチン標識をハプテンと置換し、当技術上周知の方法を使用して検出してもよい。

【0032】レポーター部分の相補鎖の存在を示す標識は、反応の選択されたエンドポイントとして検出することができる。しかし、ドナーと消光剤との距離が長いオリゴヌクレオチドはハイブリダイゼーションおよびプライマー伸長と同時に作製されるので、標識は、反応が生じているとき、すなわち「リアルタイム」でモニターすることもできる。この均一リアルタイムアッセイ方式は、存在する標的の最初の量についての半定量的または定量的情報を提供するために使用することができる。標識（例えば、蛍光強度）が反応中に変化する速度（標的増幅の一部として、または非増幅検出方法において）は、最初の標的レベルを示すものである。結果として、標的配列の最初のコピー数が多く存在する場合には、標識はより迅速に選択された閾値に到達する（すなわち、正值性への時間が短い）。また、反応経過中の標識の変化速度は、最初の標的含有量が少ない試料より最初の標的含有量が多い試料においてより急速である。これらの測定値または当技術上周知の他の測定値は、標的の存在を示すものまたは標的増幅を示すものとなる。標的の最初の量は、典型的には、実験結果を既知量の標的の結果

と比較することによって測定される。

【0033】当技術上周知の多数のドナー/消光色素対は本発明の好ましい実施態様において有用である。これらには、例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)/テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)、FITC/Texas Red™ (Molecular Probes)、FITC/N-ヒドロキシスクシンイミジル1-ピレンブチレート(PYB)、FITC/エオシンイソチオシアネート(EITC)、N-ヒドロキシスクシンイミジル1-ピレンスルホネート(PYS)/FITC、FITC/ローダミンX、FITC/テトラメチルローダミン(TAMRA)等が挙げられる。特定のドナー/消光剤対の選択は重大ではない。エネルギー移動消光機序では、ドナー蛍光団の発光波長が消光剤の励起波長と重なる、すなわち効率的なエネルギー移動、電荷移動または蛍光消光を可能にするために、2つの色素間に十分なスペクトルの重なりが存在しなければならない。P-(ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸(DABCYL)は隣接する蛍光団、例えばフルオレセインまたは5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン(EDANS)からの蛍光を効果的に消光する非蛍光消光色素である。ある種のドナー/消光剤対は上記に例示されているが、以下の実施例では、他のものが当業者に明らかであり、本発明にも有用であることがわかる。本発明のレポータープローブにおいて蛍光消光を生ずる任意の色素対は、消光が生じる機序にかかわらず、

CCAAATGACAGCTTCTGATGGAAT GACTCACTGAGTTGGAACGT

レポータープローブ(配列番号2)は、以下のとおりである。

(フルオレセイン)TACCTCGAGT(rox)GCAGCCAAAGACAGCTTCTGATGGAA

【0035】第二の反応は標的を含有せず、第一の反応と同じシグナルプライマーを含有した。第三の反応は、10⁶コピーの標的およびレポータープローブだけを含有する(すなわち、シグナルプライマーを含有しない)対照反応であった。フルオレセインの蛍光は、増幅反応中リアルタイムで検出された。図2に示すように、ドナー蛍光は、標的が存在しない場合には低く、一定のままで、レポータープローブのRERSが2本鎖形態に変換されて、切断されないことにより、反応中蛍光が消光したことを示している。シグナルプライマーが存在しない場合にも、ドナー蛍光は増幅反応中消光されたままであった。しかし、標的、シグナルプライマーおよびレポータープローブが存在する場合には、ドナー蛍光は、最初は低い、レポータープローブのRERSが2本鎖形態に変換されて、切断されて蛍光消光程度を低下すると、増幅反応の時間経過中に増加した。これらの結果は、本発明の

本発明の方法に使用するのに好適である。末端および内部の標識方法も当技術上周知であり、レポータープローブのそれぞれの部位にドナーおよび消光色素を結合するために通常使用することができる。

【0034】[実施例1] 本発明によるシグナルプライマーを含有するストランド置換増幅(Strand Displacement Amplification)反応は、合成標的配列を検出するために米国特許第5,547,861号に実質的に記載されているように実施された。最初の反応は、10⁶コピーの標的配列と、合成標的配列の増幅に適当なSDA増幅プライマーと、標的に特異的な標的結合配列およびレポータープローブの3'側配列と同一の5'側末端配列を含む本発明による100 nmのシグナルプライマーと、200 nmのレポータープローブとを含有した。RERSが無傷である場合に、フルオレセインの蛍光が消光するように、レポータープローブの配列はフルオレセインおよびローダミンX(Rox)が隣接する5'側領域にRERSを含有した。シグナルプライマーおよびレポータープローブの配列(5'側から3'側方向に示す)を以下に示す。標的結合配列は斜字体で示し、シグナルプライマーの5'側アダプター配列およびレポータープローブの同一の3'側配列は下線をつけ、レポータープローブのRERSは太字で示す。シグナルプライマー(配列番号1)は、以下のとおりである。

【化1】

【化2】

シグナルプライマーおよびレポータープローブは、蛍光消光程度の変化をモニタリングすることによって核酸標的配列を検出するために使用することができることを証明している。

【0036】同様の実験において、各々同じ配列を有するが、異なるドナー/消光色素対で標識されている、2つのレポータープローブの一方と種々のシグナルプライマーを組み合わせたものを使用して、0および250コピーのクローニングされたHIV標的DNAを検出した。シグナルプライマーおよびレポータープローブの配列は以下に5'側から3'側方向に示す。標的結合配列は斜字体で示し、シグナルプローブの5'側アダプター配列およびレポータープローブの同一の3'側配列は下線をつけ、レポータープローブのRERSは太字にしてある。シグナルプライマーは、以下のとおりである。

【化3】

GAAAGACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTTGTG (配列番号3、UA1)

GAAAGACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTTGTGGATG (配列番号4、UA2)

GAAAGACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTT (配列番号5、UA3)

GAAAGACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTTGTG (配列番号6、UA3.1)

ACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTTGTG (配列番号7、UA4)

ACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTTGTGGATG (配列番号8、UA5)

ACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTT (配列番号9、UA6)

ACGTTAGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTTGTG (配列番号10、UA6.1)

AGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTTGTG (配列番号11、UA7)

AGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTTGTGGATG (配列番号12、UA8)

AGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTT (配列番号13、UA9)

AGCCACCATACGGATACCCCTTTCTTTTAAATTTGTG (配列番号14、UA9.1)

レポータープローブ (配列番号15) は、以下のとおりである。 【化4】

(フルオレセイン)TGCCCGAGT(dabcyl)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

(フルオレセイン)TGCCCGAGT(rox)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

【0037】シグナルプライマーは、鎖長および T_m について、標的結合配列およびレポーター結合配列と異なっていた。フルオレセインの蛍光を増幅中モニターした。レポータープローブ/シグナルプライマーの組み合わせを比較するために、結果は蛍光曲線下免疫または「MOTA」として表した。曲線より下の面積が大きいほど、特定のレポータープローブ/シグナルプライマー組み合わせによって形成される蛍光が大きく、増幅された産物の検出効率が高い。両方のレポータープローブは、HIV標的を検出するために全てのシグナルプライマーと組み合わせるとよく作動するが、性能は、一般に、アピンレポーター部分を含有するレポータープローブほどよくない。

(dabcyl)TAGTGCCCGAGCACT(rox)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT (配列番号 16、TBD9)

【0039】配列番号16は、ヘアピン構造の1本鎖レポーターの5'側末端にBsoBI RERSを含有する。SDA反応は、500 nmのSDA増幅プライマーと、50 nMのバンパープライマーと、200 nMのシグナルプライマーと、200 nMのレポータープローブとを含有した。ローダミンの蛍光を増幅中モニターした。各シグナルプライマー/レポータープローブの組み合わせでは、ローダミンの蛍光は、増幅反応中に標的が存在する場合に増加した。標的が存在しない場合には、ローダミンの蛍光は反応中低下したままであった。反応の1つの結果を、配列番号3のシグナルプライ

(フルオレセイン)TAGTGCCCGAGCACT(dabcyl)ACGTTAGCCACCATACGGAT (配列番号 17、TBD10)

(フルオレセイン)TAGTGCCCGAGCACT(dabcyl)AGCCACCATACGGAT (配列番号 18、TBD11)

【0041】この実験では、上流の増幅プライマーの濃度を100 nMに低下した。増幅は、0または250コピーの標的DNAが存在する場合に実施した。標的を含有する反応は、5分ほどのインキュベーション後にフルオレセイン蛍光の急速な増加を示した。一方、標的を含有しない反応は、反応期間中、低いフルオレセイン蛍光を示した。配列番号8および配列番号17を含有する反応の結果を図3

い。しかし、これらの線状レポータープローブは、二次構造を含有するレポータープローブより短いため、高収率でより容易に合成される。フルオレセインダブシル(dabcyl)レポータープローブを使用すると、より高いMOTA値が得られ、これはこの色素対がより高い消光効率を有することを示唆している。

【0038】[実施例2] SDA反応は、実施例1に示す異なるシグナルプライマーと、0または5,000コピーのクローニングされたHIV標的と、レポータープローブとを含有するように調製した。レポータープローブの配列は以下のものであった。

【化5】

マーについて示す。多数の曲線は複製試料を表す。結果は、アダプター配列の鎖長および T_m はアッセイ性能に有意に影響しないことを示した。しかし、シグナルプライマーの標的結合配列の T_m はシグナル形成に影響を与え、より長い標的結合配列を含むシグナルプライマーはより短い標的結合配列を有するものより性能がよかった。

【0040】配列番号16を含む、3つの異なるレポータープローブを使用して、実験を繰り返して行った。追加のレポータープローブは以下のとおりであった。

【化6】

Bに示す。複数の曲線は複製試料である。レポータープローブ/シグナルプライマーの組み合わせ配列番号16/配列番号4および配列番号17/配列番号8は同様のMOTA値(それぞれ、62,147および66,051)を示したが、配列番号18/配列番号12の組み合わせは効率が低く(MOTA=49,879)、より短いプローブおよびプライマーの鎖長によるハイブリダイゼーションおよび変換効率の低さを示唆し

ている。

【0042】[実施例3] この実験では、ヘアピンおよび切断可能ではなくニッキング可能なBsoBI RERSを含むレポータープローブをSDAにおいて試験した。レポーター

(フルオレセイン)TAGTGCCTCGCCACT(dabcyl)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

【0043】このレポータープローブを、増幅反応においてシグナルプライマーとして配列番号4と共に使用した。HIV標的DNAが存在する場合には、48,000の平均MOTA値が得られ、これと比較して、陰性対照のスコアは150より低かった。同じ3'側末端配列を有するレポータープローブ配列番号16と比較したとき観察されたより低いMOTAスコアは、BsoBI部位のニッキング後の残存する短いオリゴヌクレオチドのポリメラーゼの不十分なプライミングによることがある。反応の性能は、このオリゴ

(フルオレセイン)GGTTGGCTCGAGGTTGGT(dabcyl)GAAAGACGTTAGCCACCATACGGAT

【0045】250コピーのHIV標的DNAの増幅経過中、フルオレセイン蛍光の増加が観察された。標的が存在しない場合には、このような蛍光の増加は観察されなかつ

た。レポータープローブは以下の配列（配列番号19、TBD13.）を有した。

【化7】

ヌクレオチドを安定化し、ポリメラーゼの結合のためのより大きい領域を提供するためにヘアピンの鎖長を延長することによって増強することができる。

【0044】[実施例4] この実験では、G-カルテット（G-quartet）構造およびレポーター部分としてRERSを含有するレポータープローブを使用してSDAを実施した。このレポータープローブは以下の配列（配列番号20、TBD14）を有した。

【化8】

た。

【0046】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nadeau, James G.

Hellyer, Tobin J.

<120> Probes and Methods for Detection of Nucleic Acids

<130> Universal Reporter

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic sequence for experimental model

<400> 1

ccaaaatgac agcttctgat ggaatgactc actgagttgg aacgt

45

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic sequence for experimental model

<400> 2

tacctcgagt gcagccaaaa gacagcttct gatggaa

37

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 3
 gaaagacgtt agccaccata cggataccccc ttttctttta aaattgtg 48
 <210> 4
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 4
 gaaagacgtt agccaccata cggataccccc ttttctttta aaattgtgga tg 52
 <210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 5
 gaaagacgtt agccaccata cggataccccc ttttctttta aaatt 45
 <210> 6
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 6
 gaaagacgtt agccaccata cggataccccc ttttctttta aaattg 46
 <210> 7
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 7
 acgttagcca ccatacggat accccttttc ttttaaaatt gtg 43
 <210> 8
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 8
 acgttagcca ccatacggat accccttttc ttttaaaatt gtggatg 47
 <210> 9
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 9
 acgttagcca ccatacggat accccttttc ttttaaaatt 40
 <210> 10
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 10
 acgttagcca ccatacggat accccttttc ttttaaaatt g 41
 <210> 11
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus

<400> 11
 agccaccata cggatacccc ttttctttta aaattgtg 38
 <210> 12
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 12
 agccaccata cggatacccc ttttctttta aaattgtgga tg 42
 <210> 13
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 13
 agccaccata cggatacccc ttttctttta aaatt 35
 <210> 14
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 14
 agccaccata cggatacccc ttttctttta aaattg 36
 <210> 15
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 15
 tgcccgagt aaagacgtta gccaccatac ggat 34
 <210> 16
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 16
 tagtgccga gcactgaaag acgttagcca ccatacgat 40
 <210> 17
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 17
 tagtgccga gcactagtt agccaccata cggat 35
 <210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 18
 tagtgccga gcactagcca ccatacgat 30
 <210> 19
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Human immunodeficiency virus
 <400> 19

tagtgctcgg gcactgaaag acgttagcca ccatacggat

40

<210> 20

<211> 43

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 20

ggttggctcg aggttggtga aagacgttag ccaccatacg gat

43

【図面の簡単な説明】

【図1 A】本発明の方法によるストランド置換増幅(Strand Displacement Amplification(SDA))反応における核酸標的配列の検出を例示する。

【図1 B】レポータープローブ中の蛍光標識した配列が

ニッキング可能なRERSである場合に生じる追加の反応段階を例示する。

【図2】実施例1の結果を例示する。

【図3 A】実施例2の結果を例示する。

【図3 B】実施例2の結果を例示する。

【図1 A】

【図1 B】

FIG. 1A

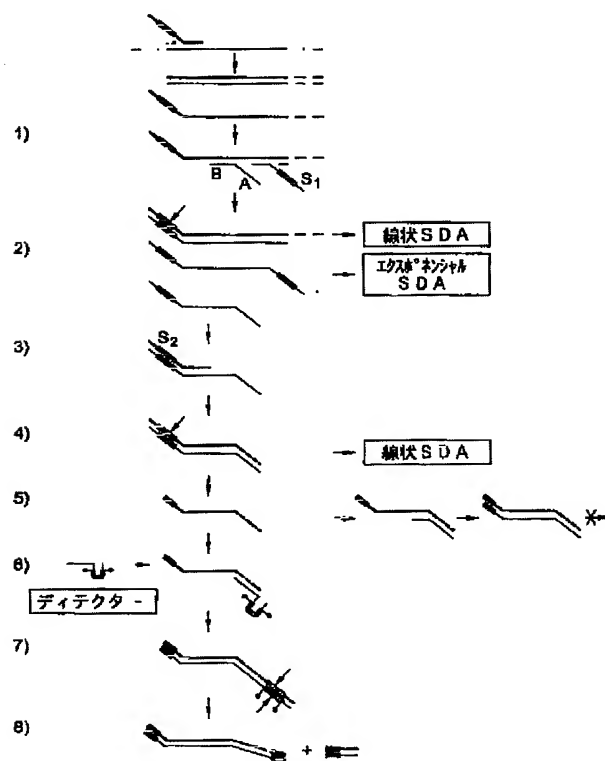
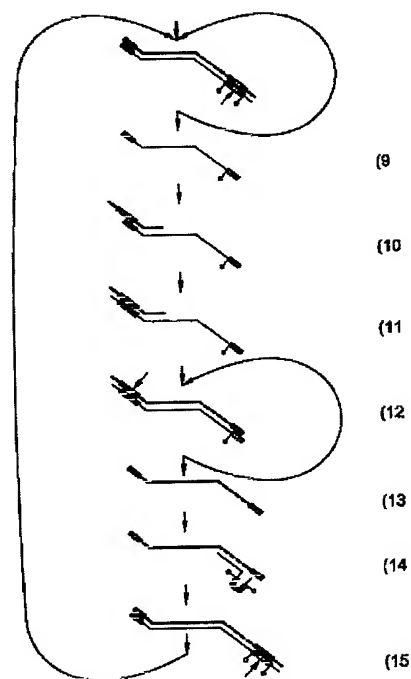
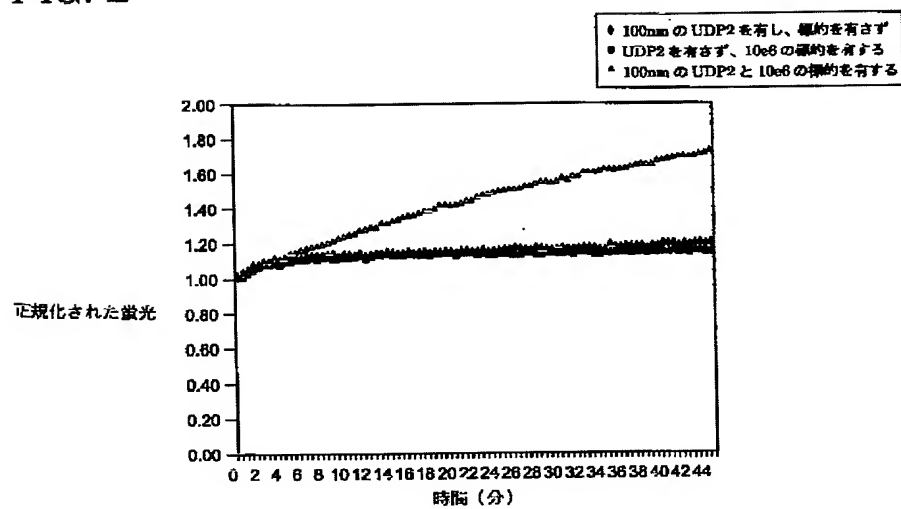


FIG. 1B



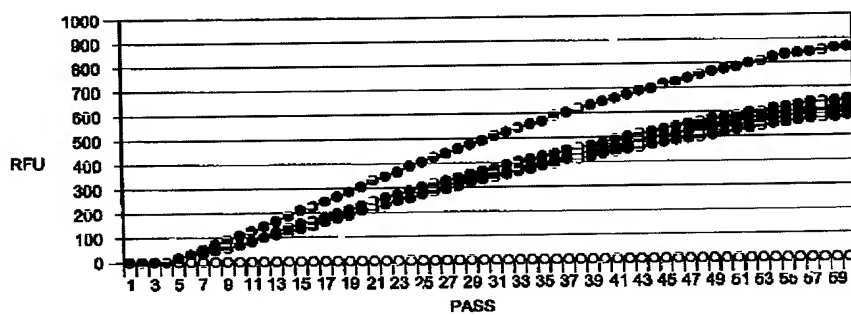
【図2】

FIG. 2



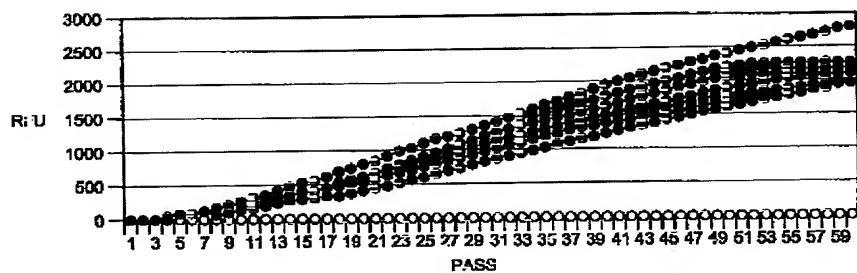
【図3A】

FIG. 3A



【図3B】

FIG. 3B



フロントページの続き

(71)出願人 595117091

1 BECTON DRIVE, FRA
NKLIN LAKES, NEW JE
RSEY 07417-1880, UNITED
STATES OF AMERICA

(72)発明者 ジェイムズ・ジー・ナデュー

アメリカ合衆国メリーランド州21042, エ
リコット・シティ, クロムウェル・コート
10311

(72)発明者 トビン・ジェイ・ヘルヤー

アメリカ合衆国メリーランド州21117, オ
ーウィングズ・ミルズ, ローヤルティ・サ
ークル 110

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA14 CA04 CA09 HA12

4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ01

QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35

QR42 QR56 QR62 QS25 QS34

QX02